

Die Heterozygotie des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des thrombozytären Glykoproteins Ib alpha als Risikofaktor für koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt in Niedrigrisikogruppen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von: Weipert, Christine
aus: Heilbronn-Sontheim

Gießen, 2013

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH

Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. Gregor Bein

Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Gardemann

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Klaus T. Preissner

Tag der Disputation: 20.05.2014

Diese Arbeit ist meinen lieben Eltern

Dr. med. Hannelore und

Dipl. Ing. Carl-Ludwig Ferdinand Weipert

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Bedeutung der koronaren Herzkrankheit und ihrer Komplikationen für Morbidität und Mortalität	1
1.2. Etablierte Risikofaktoren für koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt	4
1.3. Genpolymorphismen als Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit und den Myokardinfarkt	5
1.4. Physiologie der Thrombusbildung	6
1.5. Aufbau und Funktion des thrombozytären Glykoproteins Ib alpha	8
1.6. Der Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des thrombozytären Glykoproteins Ib alpha	11
1.7. Ziel dieser Arbeit	13
2. Material	15
2.1. Kleinmaterial	15
2.2. Geräte	15
2.3. Reagenzien	17
2.4. Primer	19
3. Methodenteil	20
3.1. Charakterisierung der Studienpopulation	20
3.2. Diagnostik der koronaren Herzkrankheit	21
3.3. Messung von etablierten Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarktes	27
3.3.1 Triglyzeride	27
3.3.2 Cholesterin	29
3.3.3. Apolipoprotein AI und Apolipoprotein B	32
3.3.4. Lipoprotein (a)	33
3.3.5. Blutglucose	34

	Seite
3.4. Bestimmung des Längenpolymorphismus	
„variable number of tandem repeats“ des thrombozytären	
Glykoproteins Ib alpha	37
3.4.1. Leukozyten-DNA-Isolierung	37
3.4.2. Polymerase-Chain-Reaction	38
3.4.2.1. Grundprinzip der Reaktion	38
3.4.2.2. Durchführung der Polymerase Chain Reaction	38
3.4.3. Nachweis der amplifizierten DNA mittels	
Agarose-Gel-Elektrophorese	41
3.4.3.1. Prinzip der Agarose-Gel-Elektrophorese	41
3.4.3.2. Durchführung der Agarose-Gel-Elektrophorese	41
3.5. Definition der Hoch- und Niedrigrisikogruppen	43
3.6. Statistische Methoden	43
4. Ergebnisse	45
4.1. Charakterisierung der Studienpopulation	45
4.2. Verhältnis zwischen koronarer Herzkrankheit und Lebensalter	48
4.3. Verhältnis zwischen Myokardinfarkt und Lebensalter	49
4.4. Zusammenhang zwischen koronarer Herzkrankheit und	
Myokardinfarkt	50
4.5. Etablierte Risikofaktoren und protektive Faktoren der koronaren	
Herzkrankheit	53
4.6. Etablierte Risikofaktoren und protektive Faktoren des	
Myokardinfarktes	54
4.7. Verteilung der Genotypen des Längenpolymorphismus	
„variable number of tandem repeats“ in der Studienpopulation	56
4.8. Vergleich der klinischen und klinisch-chemischen koronaren	
Risikofaktoren bei den vier häufigsten Genotypen des	
Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“	
BC, BD, CC und CD	58

	Seite
4.9. Beziehung zwischen dem Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha und der koronaren Herzkrankheit	59
4.9.1. Risiko der koronaren Herzkrankheit	59
4.9.2. Ausmaß der koronaren Herzkrankheit	62
4.10. Beziehung zwischen dem Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha und der koronaren Herzkrankheit in Niedrigrisikogruppen mit günstigem Lipidprofil	62
4.11. Beziehung zwischen dem Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha und dem Myokardinfarkt	63
4.12. Beziehung zwischen dem Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha und dem Risiko für einen Myokardinfarkt in Niedrigrisikogruppen mit günstigem Lipidprofil	66
5. Diskussion	68
5.1. Der thrombozytäre Glykoprotein Ib-IX-V-Komplex: Struktur, Funktion und Lokalisation des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“	68
5.2. Zusammenfassung der Ergebnisse	70
5.3. Stellen die heterozygoten Genotypen des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha einen unabhängigen Risikofaktor für die koronare Herzkrankheit bzw. den Myokardinfarkt dar?	71
5.3.1. Zusammenhang zwischen Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha und dem Risiko für eine koronare Herzkrankheit	71

	Seite
5.3.2. Zusammenhang zwischen Längenpolymorphismus „variable Number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha und dem Risiko für einen Myokardinfarkt	74
5.4. Mögliche Erklärungen für die unterschiedlichen Studienergebnisse	76
5.4.1. Studiendesign	78
5.4.2. Definition unterschiedlicher Subgruppen	78
5.4.3. Erfassung und Definition der Diagnose	80
5.4.4. Geschlechtsunterschiede	82
5.4.5. Rassenunterschiede	82
5.4.6. Kontrollgruppe	83
5.4.7. Studiengröße	84
5.4.8. Design der vorliegenden Studie	84
5.5. Weitere Polymorphismen des Glykoproteins Ib alpha	85
5.6. Therapeutische Bedeutung des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha	87
6. Zusammenfassung	89
7. Summary	90
8. Abkürzungsverzeichnis	91
9. Tabellenverzeichnis	95
10. Abbildungsverzeichnis	97
11. Literaturverzeichnis	98
12. Erklärung zur Dissertation	114
13. Danksagung	115

1. Einleitung

1.1. *Bedeutung der koronaren Herzkrankheit und ihrer Komplikationen für die Morbidität und Mortalität*

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist die klinische Manifestation der Atherosklerose an den Koronararterien. Die KHK und deren Folgeerkrankungen stellen besonders in den Industrieländern immer noch mit 30 % aller Todesfälle pro Jahr die Haupttodesursachen dar. Mit einer Inzidenz von 300-400/100.000 Personen/Jahr in Deutschland, von denen 74.000 letal enden, stellt der Myokardinfarkt (MI) eine der häufigsten Todesursachen und Hauptkomplikationen der KHK dar. In Deutschland erleiden 30 % der Männer und 15 % der Frauen im Laufe ihres Lebens einen MI.

Man rechnet damit, dass ca. 5-10 % der Männer an einer KHK leiden. Männer haben vor dem 60. Lebensjahr ein doppelt so hohes KHK-Risiko wie Frauen, welches sich im höheren Lebensalter jedoch ausgleicht. Pathophysiologisch stellt die KHK eine Koronarinsuffizienz dar, die durch ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf des Myokards charakterisiert ist.

Die Pathogenese der Atherosklerose zeigt folgende Ereignissequenz (Abb. 1): Verletzung des Endothels bzw. vaskuläre Dysfunktion, Rekrutierung von Monozyten und Formation von Makrophagen, Ablagerung von Lipiden, Proliferation der glatten Muskelzellen durch Wachstumsfaktoren, u.a. aus Thrombozyten, und Synthese von extrazellulärer Matrix (Badimon, 1993 (b)). Diese pathogenetische Sequenz der Atherosklerose geht über Jahre und beginnt oft schon in der Kindheit mit subintimalen Fettablagerungen, den so genannten „fatty streaks“. Durch lokale Produktion von Wachstumsfaktoren, u.a. aus Thrombozyten, wird die Fibroblasten- und Myozytenproliferation gefördert, was dann zu fibrösen Plaques führt. Diese Plaques können rupturieren und thrombogenes subintimales Gewebe freisetzen, auf dem sich dann plättchenreiche Thromben bilden können, die zum subtotalen oder totalen Gefäßverschluss führen (Andrews, 1999). Diese Vorgänge stellen ein Schlüsselereignis in der Entstehung eines akuten ischämischen Syndroms dar (Badimon, 1993 (b)).

Die Gefäßverletzungen sind wichtige Ereignisse bei der Entstehung und dem Fortschreiten der Atherosklerose (Fuster, 1992/ Badimon, 1993 (a)/ Badimon, 1993 (b)). Dabei werden drei verschiedene Grade der Gefäßverletzung unterschieden: beim

Typ I gibt es funktionelle Veränderungen des Endothels ohne eine signifikante Störung der Morphologie. Beim Typ II kommt es zur Freilegung des Endothels und zur Beschädigung der Intima. Die Lamina elastica interna bleibt jedoch intakt. Bei der am weitesten fortgeschrittenen Verletzung, dem Typ III, ist sowohl das Endothel freigelegt als auch die Intima und Media verletzt (Fuster 1992/ Badimon, 1993 (a)/ Badimon, 1993 (b)). Vor allem Typ II- und Typ III-Gefäßverletzungen können zusammen mit hohen Scherkräften in stenosierten Gefäßen (turbulente Strömung) die Thrombozyten aktivieren und durch eine Thrombose zum akuten ischämischen Ereignis führen (Badimon, 1993 (a)) und eine der Komplikationen der KHK wie instabile Angina pectoris, akuten MI und plötzlichem Herztod verursachen (Andrews, 1999 /Fuster, 1992/ Shen, 2000/ Reiner, 2001). Die KHK manifestiert sich hauptsächlich als Angina pectoris, MI und plötzlicher Herztod. Weitere Manifestationen sind ischämische Herzmuskelschädigung mit Linksherzinsuffizienz und Arrhythmien. Im Gegensatz zur stabilen Angina pectoris, die durch eine verminderte Sauerstoffversorgung aufgrund eines meist stabilen Plaques verursacht wird, liegt beim akuten Koronarsyndrom (instabile Angina pectoris, nicht-transmuraler und transmuraler MI) pathogenetisch eine Plaqueruptur mit Thrombozytenaggregation zugrunde.

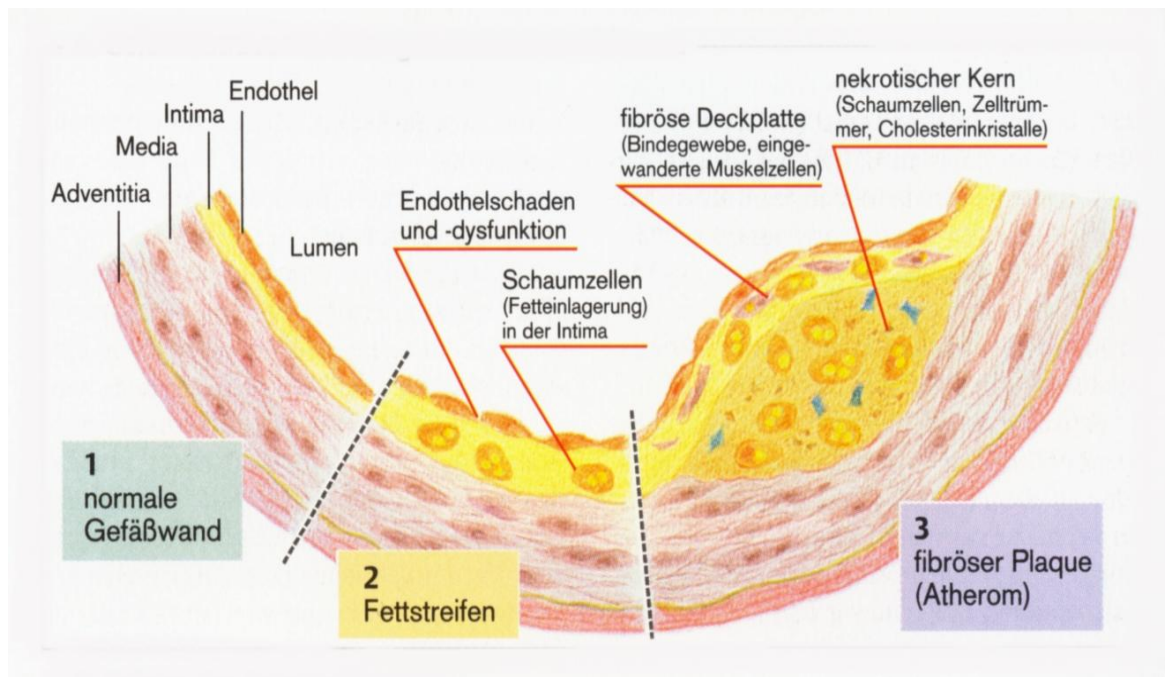


Abb. 1: Ätiologie der Atherosklerose

Links (1): normale Arterienwand mit den vier Schichten (von innen nach außen) Endothel, Intima, Media, Adventitia. Mitte (2): Entstehung der Fettstreifen („fatty streaks“) durch Endothelschäden und Fetteinlagerung in der Intima. Das eingelagerte Fett wird von den Makrophagen phagozytiert, und die Makrophagen wandeln sich zu Schaumzellen um. Rechts (3): Endstadium des fibrösen Plaques (Atherom) mit fibröser Deckplatte und vermehrten glatten Muskelzellen sowie nekrotischem Kern aus Zelltrümmern, Schaumzellen und Cholesterinkristallen (Aus: Stephan Silbernagl, Florian Lang: Taschenatlas der Pathophysiologie, Thieme Verlag 1998).

1.2. Etablierte Risikofaktoren für koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt

Schon länger besteht das Konzept der kardiovaskulären Risikofaktoren (Assmann, 1994/ Assmann, 1988/ Cullen, 1999/ Cullen, 1998 /Kohler, 1992 / Link, 2001/ Schaefer, 1998). „*Das Wort Risiko lässt sich aus dem Griechischen „rhiza“ = Wurzel ableiten und weist somit im übertragenen Sinne auf die „Wurzel“ des Übels hin. Der Begriff Risikofaktor wurde durch die Präsentation der Framinghamstudie im Jahre 1961 eingeführt. Ein Faktor, der ursächlich zu einer Erkrankung führt, wird seitdem als Risikofaktor bezeichnet.*“ (Schaefer, 1998). Dem Begriff des „Risikofaktors“ gegenüberzustellen ist der Begriff des „Risikoindikators“. Beim Risikoindikator findet sich eine statistische Assoziation zwischen einem Faktor und einer bestimmten Erkrankung. Ein Risikoindikator wird zum Risikofaktor, wenn durch Studien demonstriert werden kann, dass bei Absenkung oder Beseitigung dieses Faktors das Risiko, diese Erkrankung zu erleiden, entweder erniedrigt oder beseitigt wird.

Die etablierten Risikofaktoren für die KHK werden klassischerweise in zwei Gruppen eingeteilt, die beeinflussbaren und die unbeeinflussbaren Risikofaktoren. Zu den unbeeinflussbaren zählen Alter, männliches Geschlecht und eine positive Familienanamnese (Winkelmann, 2000). Die beeinflussbaren Risikofaktoren werden wiederum in solche erster und solche zweiter Ordnung unterteilt. Zu den Faktoren erster Ordnung gehören Hypercholesterinämie, Hypertriglyzeridämie, Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas und Rauchen (Winkelmann, 2000). Die Risikofaktoren zweiter Ordnung umfassen Hyperfibrinogenämie, Defekte im Tissue-Type-Plasminogen-Activator (t-PA), Bewegungsmangel und eine Typ-A-Persönlichkeit (ehrgeiziges, kompetitives und konfliktbereites Auftreten).

Je nach Anzahl der Risikofaktoren erster Ordnung erhöht sich das Infarktrisiko verglichen mit dem einer gesunden Person (zwei Faktoren: vierfaches Risiko, drei Risikofaktoren: zehnfaches Risiko).

Die einzelnen Risikofaktoren sollten nie isoliert, sondern immer im Zusammenhang mit dem Gesamtrisiko des Patienten für eine KHK betrachtet werden (Assmann, 1994/ Cullen, 1998/ Schaefer, 1998), da die KHK multifaktorielle Ursachen hat (Assmann, 1988/ Ridker, 1999/Cullen, 1999/ Grant,2003/ Winkelmann, 2000) und eine polygenetische Erkrankung ist (Kandzari, 2001/ Winkelmann, 2000). Viele

Risikofaktoren sind kontinuierliche Variablen (z.B. Alter), die interagieren, und aufgrund der Anzahl und Schwere das Gesamtrisiko beeinflussen (Assmann, 1994/ Grant, 2003).

1.3. Genpolymorphismen als Risikoindikatoren für die koronare Herzkrankheit und den Myokardinfarkt

Es wurden verschiedene Kandidaten-Gene identifiziert, die im Verdacht stehen, mit bestimmten Erkrankungen assoziiert zu sein. Die DNA-Sequenzen (Desoxyribonukleinsäure) dieser Gene wurden zwischen verschiedenen Individuen und Rassen verglichen. Neben vielen anderen Entdeckungen im Bereich der molekularbiologischen Forschung war besonders die Entwicklung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durch Mullis zur einfacheren und effektiven Vervielfältigung solcher DNA-Sequenzen wichtig (Mullis, 1990/ Mullis, 1987/ Schutzbank, 1993). Der Begriff „genetischer Polymorphismus“ ist durch das Vorhandensein eines oder mehrerer Allele an einem oder vielen Genloci definiert (Thiery, 1998). Ist das seltene Allel mit mehr als 1 % in der Population vorhanden, wird die Mutation als Polymorphismus bezeichnet (Thiery, 1998/ Winkelmann, 2000 / Bray, 1999).

Da Genpolymorphismen sehr häufig sind, treffen bei der KHK als multifaktorielle Erkrankung sehr wahrscheinlich mehrere für die Atherosklerose prädisponierende Allele zusammen (Thiery, 1998/ Winkelmann, 2000).

Um die genetischen Risikofaktoren bzw. -indikatoren für die KHK zu erforschen, ist es sinnvoll, die Gene zu untersuchen, die z.B. über eine Veränderung des Lipoproteinmetabolismus, des Blutdruckes oder der zellulären und plasmatischen Gerinnung die Entstehung und Progression der KHK beeinflussen (Winkelmann, 2000/ Thiery, 1998/ Walter, 2000).

Es wurde festgestellt, dass gerade jüngere Patienten mit thrombotischen Ereignissen oft nicht die etablierten Risikofaktoren aufweisen (Melissari, 1992), was die Erforschung genetischer Risikofaktoren bzw. -indikatoren jenseits der etablierten Risikofaktoren erforderlich macht. Auch stellen die genetischen Marker ein besseres und präziseres Maß für das lebenslange Risiko dar als die jeweiligen Proteinspiegel im Plasma, die Schwankungen aus verschiedenen Ursachen unterliegen (Ridker, 1999).

Allerdings weisen manche Polymorphismen in unterschiedlichen Ländern und bei unterschiedlichen Bevölkerungen verschiedene Häufigkeitsverteilungen auf, wie dies z.B. für die Faktor V Leiden-Mutation (aktivierte Protein-C-Resistenz) festgestellt wurde (Rees, 1995/ Zama, 1996). So konnte diese Mutation bei Europäern mit einer Frequenz von 4,4 % gefunden werden, bei Afrikanern und Asiaten dagegen nicht (Rees, 1995). Gleiches gilt für den hier untersuchten Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ (VNTR) des thrombozytären Glykoproteins Ib alpha (GPIb α), bei dem in mehreren Studien unterschiedliche Genfrequenzen bei Europäern, Afro-Amerikanern und Asiaten nachgewiesen wurde (Afshar-Kharaghan, 2004/ Lopez, 1992/ Ishida, 1996/ Gonzalez-Conejero, 1998/ Murata, 1998/ Ito, 1999/ Murata, 1997/ Mercier, 2000 / Mikkelsen, 2001). Demzufolge kann ein nachgewiesener genetischer Risikoindikator in einer bestimmten Population nicht ohne weiteres auf eine andere übertragen werden (Ridker, 1999/ Kenny, 2002).

Außerdem konnte in verschiedenen Studien mit Migranten gezeigt werden, dass sich das Risiko für kardiale Ereignisse bei diesen Personen ändern kann und somit ein Zusammenhang zwischen Genen und Umwelt bestehen muss (Grant, 2003).

1.4. *Physiologie der Thrombusbildung*

Thrombozyten sind für eine Vielzahl adhäsiver Interaktionen von zentraler Bedeutung, um ihre primäre Aufgabe, die Blutstillung nach Zerstörung der vaskulären Integrität zu erfüllen (Lopez, 1994/ Andrews, 1999/ Shen, 2000/ deGroot, 2002). Die Thrombusbildung an der Gefäßwand wird in Abhängigkeit von der Zeit, dem Ort und dem Ausmaß der Gefäßwandverletzung reguliert, sodass die Blutung des verletzten Gefäßes minimiert wird, während gleichzeitig vermieden werden soll, dass nahe gelegene unverletzte Gefäße verschlossen werden (Roth, 2001). Da Thrombozyten nicht zwischen einer Wunde und einer atherosklerotisch veränderten Gefäßwand unterscheiden können (deGroot, 2002), adhärieren sie ebenso an sklerotischen Läsionen nach Plaqueruptur oder werden durch pathologische Scherkräfte aktiviert (Andrews, 1999/ Clemetson, 1997). Die Thrombozytenadhäsion am von-Willebrand-Faktor (vWF) im Subendothel benötigt hohe Scherkräfte, wie sie im arteriellen Gefäßsystem und in sklerotisch verengten Gefäßen vorkommen (Lopez, 1992/ Clemetson, 1997/ Englund, 2001/ Roth, 2001/ Berndt, 2001). Dieser Prozess wird vor allem durch den GPIb-IX-V-

Komplex auf Thrombozyten vermittelt (Lopez, 1992). Die scherkraftinduzierte Thrombozytenadhäsion ist am kritischsten in Gefäßen mit geringem Durchmesser wie Arteriolen, Kapillaren und atherosklerotisch verengten Gefäßen (Lopez, 1992 / Lopez, 1994 (a)/ Andrews, 2003). Normalerweise gibt es keine Bindung zwischen dem vWF im Subendothel und GPIb α auf ruhenden Thrombozyten (Clemetson 1997/ Englund 2001/ Lopez, 1994 (a)). Der GPIb-IX-V-Komplex ist also der wichtige Kontaktpunkt zwischen Thrombozyten und Gefäßwand bei der Hämostase und der Thrombose (Lopez, 1994 (a)/ Roth, 2001/ Ruggeri, 1999/ Kandzari, 2001/ Nurden, 1995). Der hämostatische Prozess beginnt mit einer Aktivierung der Thrombozyten durch exponiertes Subendothel, zirkulierende Zytokine und andere Agonisten, welche während der Verletzung der Gefäßwand, der Plaque-Ruptur oder bei einer Angioplastik freigesetzt werden (Kandzari, 2001/ Lopez, 1992). Bei einer Verletzung des Endothels bindet die A3-Domäne des frei zirkulierenden vWF an freigelegtes Kollagen in der subendothelialen Matrix (Sugimoto, 2002). Durch Immobilisation und Scherkräfte erfolgt eine Konformationsänderung im vWF (Englund, 2001). Über die A1-Domäne im vWF bindet das GPIb α des GPIb-IX-V-Komplexes an das Subendothel (Sugimoto, 2002/ Lopez, 1998/ Clemetson, 1997/ Uff, 2002). Durch die Verbindung zwischen GPIb α und vWF werden die Thrombozyten nicht komplett angehalten, sondern rollen auf dem Endothel (Huizinga, 2002/ Berndt, 2001). Dadurch wird die Kontaktzeit zwischen Thrombozyten und subendothelialer Matrix verlängert (Huizinga, 2002). Der GPIb-IX-V-Komplex initiiert also das Anhalten der Thrombozyten (Frederickson, 1998). Nach der GPIb-IX-V- abhängigen Adhäsion an den vWF kommt es zu einer Neuordnung des thrombozytären Zytoskeletts mit einer Formänderung der Thrombozyten und einer Sekretion von u.a. Adenosindiphosphat (ADP), welches weitere Thrombozyten an den sich entwickelnden Thrombus bindet (Andrews, 2003). Ungeachtet der Wichtigkeit der initialen Ereignisse entsteht ein Thrombus vor allem durch die Verbindung (Aggregation) der Thrombozyten untereinander (Ruggeri, 1999). An das GPIb-IX-V-vermittelte Anhalten der Thrombozyten schließt sich die irreversible Verbindung zwischen Fibrinogen bzw. vWF und dem GP IIb-IIIa, einem Integrin auf Thrombozyten, an (Suigimoto, 2002/ Lopez, 1998/ Andrews, 2003/ Berndt, 2001). An aktiviertes GPIIb-IIIa gebundenes Fibrinogen ist die wichtigste Brücke zwischen aggregierenden Thrombozyten (Ruggeri, 1999 (b)/ Kandzari, 2001). Der Thrombus wird außerdem durch unlösliches Fibrin (sekundäre Hämostase) (deGroot, 2002) und

Kollagen, welches an das GPIa-IIa (Kandzari, 2001) und GP IV (Nuyttens, 2010) auf Thrombozyten bindet, stabilisiert.

1.5. *Aufbau und Funktion des thrombozytären Glykoproteins Ib alpha-Komplexes*

Der GPIb-IX-V-Komplex (Abb. 2) ist einer der Hauptrezeptoren der Thrombozytenoberfläche. Auf jedem Thrombozyt sind ca. 20.000-25.000 GPIb α , GPIb β und GPIX sowie ca. 10.000 GPV vorhanden (Mazzucato, 1996/ Nurden, 1995/ Modderman, 1992). Der GPIb-IX-V-Komplex wird auch als CD42a-d bezeichnet (Cluster of Differentiation) (Reiner, 2001/ Jilma-Stohlawetz, 2003/ Andrews, 2003). Fehlt dieser Komplex bzw. Teile davon auf den Thrombozyten oder liegen funktionelle Defekte vor, so kommt es zum autosomal rezessiv vererbten Bernard-Soulier-Syndrom mit verlängerter Blutungszeit, Thrombozytopenie und großen Thrombozyten (Lopez, 1998). Außerdem ist der GPIb-IX-V-Komplex in sehr viel geringerer Konzentration auf Endothelzellen zu finden (Lopez, 1998). Offensichtlich vermittelt der GPIb-IX-V-Komplex auch Zell-Zell-Interaktionen durch Bindung seiner Gegenrezeptoren wie Mac-1, einem Leukozyten-Integrin (Simon, 2000/ Ehlers, 2003) und P-Selectin auf Endothelzellen (Romo, 1999).

Der GPIb-IX-V-Komplex gehört zur Gruppe der Proteine mit leucinreichen Repeats (LRR) (Ishida, 1995/ Clemetson, 1997/ Lopez, 1994 (a)/ Aramaki, 1999 /Lopez, 1998/ Berndt, 2001). Er besteht aus den vier bereits oben genannten Glykoproteinen, die in einer festgelegten Stöchiometrie miteinander verbunden sind: 2 GPIb α : 2 GPIb β : 2 GPIX : 1 GPV (Clemetson 1997 /Lopez, 1994 (b)/ Lopez, 1998). Dabei sind GPIb α und GPIb β durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (Lopez, 1992/ Moroi, 1984/ Lopez, 1994 (b)/ Lopez, 1994 (a)/ Moddermann, 1992). GPV und GPIX sind nicht-kovalent an den Komplex gebunden (Moddermann, 1992/ Clemetson, 1997 /Lopez, 1998/ Lopez, 1992/ Lopez, 1994 (b)/Lopez, 1994 (a)). GPIb β und GPIX enthalten jeweils eine einzelne leucinreiche Sequenz (Nurden, 1995), GPV enthält dagegen fünfzehn solcher Sequenzen (Andrews, 1999).

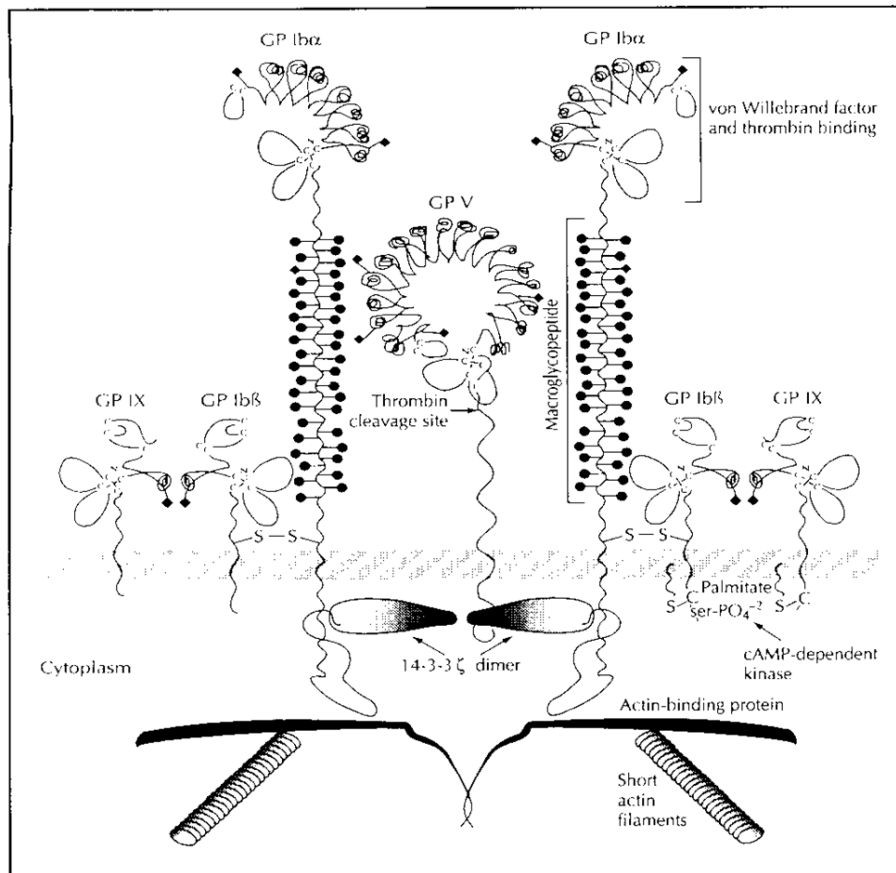


Abb 2.: Aufbau des Glykoprotein Ib-IX-V-Komplexes

Dargestellt ist der Komplex aus GPIb α , GPIb β , GPIX und GPV mit einer Stöchiometrie von 2 : 2 : 2 : 1. Abkürzungen: GP: Glykoprotein. (Aus: Lopez et al: Bernard-Soulier-Syndrome, Blood 1998: 4397-4418).

Eine der wichtigsten Komponenten des Komplexes ist das GPIb α (Ishida, 1995/ Clemetson 1997/ Englund, 2001/ Mazzucato, 1996/ Huizinga, 2002). Die N-terminale, kugelförmige Domäne enthält neben sieben leucinreichen Repeats, die C-terminale, anionische Region und drei sulfatierte Tyrosine, die als vWF- und Thrombin-Bindungsstelle fungieren (Lopez, 1998/ Kaski, 1996/ Nurden, 1995/ Lopez, 1994 (a)/ Huizinga, 2002/ Berndt, 2001). Neuere Studien fanden dagegen acht leucinreiche Repeats im GPIb α (Huizinga, 2002/ Uff, 2002). Diese Diskrepanz lässt sich über die frühere Definition der leucinreichen Repeats erklären, bei der an jedem Ende dieser Struktur eine überhängende Sequenz als flankierende Sequenz bezeichnet wurde (Uff, 2002). Durch eine geänderte Definition des Anfangs und des Endes der leucinreichen Repeats, wurden diese Sequenzen in die Struktur als zusätzlicher Repeat aufgenommen (Uff, 2002). Die N-terminale Domäne und die leucinreichen Repeats zwei bis vier – und dort vor allem das Asparagin an Position 6 des ersten und sechsten Repeats (Afshar-

Kharghan, 2000) –sind für die Bindung an vWF wichtig (Shen, 2000/ Whisstock, 2002/ Afshar-Kharghan, 2000). An die C-terminale Region schließt sich die nur beim GPIb α vorhandene mucinreiche Makroglykopeptidregion mit O-glykosilierten Prolinen, Serinen und Threoninen an (Ishida, 1995/ Kaski, 1996/ Nurden, 1995/ Clemetson, 1997/ Lopez, 1994 (a)/ Lopez, 1998/ Li, 2002). Sie stellt eine Art „Abstandshalter“ zwischen der ligandenbindenden Domäne und der Plasmamembran dar (Ishida, 1995/ Lopez, 1994 (a)). Die Makroglykopeptidregion enthält den in der vorliegenden Untersuchung analysierten Längenpolymorphismus VNTR mit vier Varianten. In jedem Repeat sind fünf potentielle Stellen für die O-Glykosilierung, welche das Molekulargewicht um 6 kDa pro Repeat erhöhen bzw. um 32 Å verlängern können und somit auch die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit in der Gel-Elektrophorese bewirken (Lopez, 1992/ Lopez, 1998/ Nurden, 1995/ Reiner, 2001). Aufgrund der unterschiedlichen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit werden die vier GPIb α -Varianten A, B, C und D genannt (Moroi, 1984). An die Makroglykopeptidregion schließt sich die hydrophobe transmembranöse und die zytoplasmatische Domäne an (Lopez, 1994 (a)/ Kaski, 1996/ Lopez, 1998). Die zytoplasmatische Domäne ist an das aktinbindende Protein und das 14-3-3- ξ -Protein gebunden (Lopez, 1998/ Lopez, 1994 (a)/ Lopez, 1994 (b)/ Clemetson, 1997). Die Assoziation mit dem aktinbindenden Protein verknüpft den GPIb-IX-V-Komplex mit einem Netzwerk von kurzen submembranösen Aktinfilamenten und dem Zytoskelett (Lopez, 1998). Diese Interaktion ist für die diskoidale Form der ruhenden Thrombozyten wichtig. Bei Patienten mit Bernard-Soulier-Syndrom mit fehlendem GPIb-IX-V-Komplex kann die Diskusform der Thrombozyten nicht ausgebildet werden (Englund 2001/ Lopez, 1994 (a)/ Lopez, 1994 (b)).

Die Gene für die Glykoproteine des Komplexes sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert: GPIb α auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p12), GPIb β auf dem langen Arm von Chromosom 22 (22q11.2), GPIX und GPV auf dem langen Arm von Chromosom 3 (3q21 bzw. 3q29) (Lopez, 1998/ Roth, 1996).

Alle Gene, bis auf das für GPIb β , enthalten jeweils die kodierende Sequenz in einem Exon (Lopez, 1998/ Wenger, 1988). Das GPIb β -Gen hat ein Intron zehn Basenpaare nach dem Start der kodierenden Sequenz (Lopez, 1998). Alle Gene, außer dem für GPIX, haben nur ein Intron (GPIX: zwei Introns) (Lopez 1998/ Lopez, 1994 (a)). Diese geringe Anzahl an Introns ist allen leucinreichen Proteinen gemeinsam (Lopez, 1998).

1.6. *Der Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des thrombozytären Glykoproteins Ib alpha*

Der Längenpolymorphismus VNTR entsteht durch die ein- bis vierfache Wiederholung einer 13-Aminosäuresequenz in der Makroglykopeptidregion des GPIb α (Serin³⁹⁹-Threonin⁴¹¹) (Aramaki, 1999/ Ishida, 1995/ Lopez, 1992/ Meyer, 1990/ Du, 1992). Diese „tandem repeats“ der DNA sind eine oder mehrere unmittelbar aufeinanderfolgende Kopien eines Nukleotidmusters (Benson, 1999). Allel A ist mit vier Repeats die längste, Allel D mit nur einem Repeat die kürzeste Variante (Abb. 3). Dabei besitzt ein Individuum immer nur ein bis zwei Varianten des Längenpolymorphismus VNTR, d.h. es ist homo- oder heterozygot für diesen Polymorphismus (Ishida, 1995). Die Länge der Allele unterscheidet sich von A über B nach C und D um jeweils 39 Basenpaare bzw. 13 Aminosäuren (Nurden, 1995). Der Mechanismus, durch den diese Makroglykopeptidregion mit dem Längenpolymorphismus VNTR entstanden ist, ist nicht ganz geklärt, da die genomische Struktur von GPIb α kein Intron enthält, welches die kodierende Region unterbricht (Lopez, 1992). Die einzige Erklärung bietet die DNA-Sequenz, bei der die tandem repeats von direkten Octanucleotid-Repeats eingerahmt werden (Lopez, 1992). Solche direkten Repeats rahmen oft DNA-Regionen ein, die durch Transposition entstanden sind (Lopez, 1992), d.h. einer Umstellung genetischen Materials innerhalb eines Chromosoms. Dies lässt vermuten, dass GPIb α durch Transposition eines anderen Gens entstanden sein könnte, eventuell eines, welches ein Mucin kodiert (Lopez, 1992). Das Hinzufügen von tandem repeats könnte die Interaktion zwischen GPIb α und vWF durch das Hervorstehen von GPIb α in das Gefäßlumen verändern (Ishida, 1995/ Lopez, 1998/ Lopez, 1992), und die Empfänglichkeit der Thrombozyten für eine scherkraftinduzierte Aktivierung beeinflussen (Lopez, 1992). Da der Polymorphismus in der Makroglykopeptidregion vorkommt, interagiert er nicht direkt mit der Bindung der Liganden (Meyer, 1990). Die evolutionäre Selektion der optimalen Rezeptorenlänge wäre dann durch die Balance zwischen effizienter Hämostase und der Gefahr einer Thrombose geprägt (Lopez, 1992).

Ozelo et al. konnten dagegen bei Gorillas und Schimpansen, den beiden dem Menschen am nächsten verwandten Primaten, eine Homozygotie für VNTR-A (mit 4 Repeats)

nachweisen. Diese Beobachtung deutet einen Verlust an Repeats während der Evolution hin (Ozelo, 2004 (a)).

Die längste Variante A des Längenpolymorphismus VNTR wurde bisher vor allem bei Asiaten, insbesondere bei Japanern, gefunden (Ishida, 1995/ Meyer, 1990/ Ishida, 1996). Legt man die Hypothese des menschlichen Ursprungs aus Afrika zu Grunde, so könnte das Allel A nach der Trennung der asiatischen von der kaukasischen Rasse entstanden und durch die geographische und historische Isolation in Japan akkumuliert sein (Ishida, 1995). Die Verteilung der Allele ist in einzelnen Populationen unterschiedlich (Aramaki, 1999/ Meyer, 1990). Das C-Allel (ca. 85,5 %) ist bei Europäern am häufigsten, gefolgt von B- und D-Allel mit jeweils ähnlichen Häufigkeiten (7,8 % bzw. 6,4 %) (Meyer, 1990/ Corral, 1998).

Ishida et al. entdeckten dagegen bei 103 Japanern von den Europäern abweichende Genotypfrequenzen, und wie bereits erwähnt, das häufigere Vorkommen des A-Allels (Ishida, 1995).

Lopez et al. fanden eine seltene Variante des C-Allels (C'-Variante), bei der im zweiten Repeat eine stille Mutation stattgefunden hat (Lopez, 1992). Muckian et al. entdeckten eine weitere Variante des Längenpolymorphismus VNTR, VNTR E, in der jeglicher Repeat der 39 Basenpaarensequenz fehlt. Bei dieser Variante ist die Makroglykopeptidregion um 13 Aminosäuren kürzer als VNTR D (Muckian, 2000). Meyer et al. fanden eine Variante des VNTR-Längenpolymorphismus mit 7 Repeats (Meyer, 1990). Die drei letztgenannten Varianten wurden in der hier untersuchten Studienpopulation nicht gefunden.

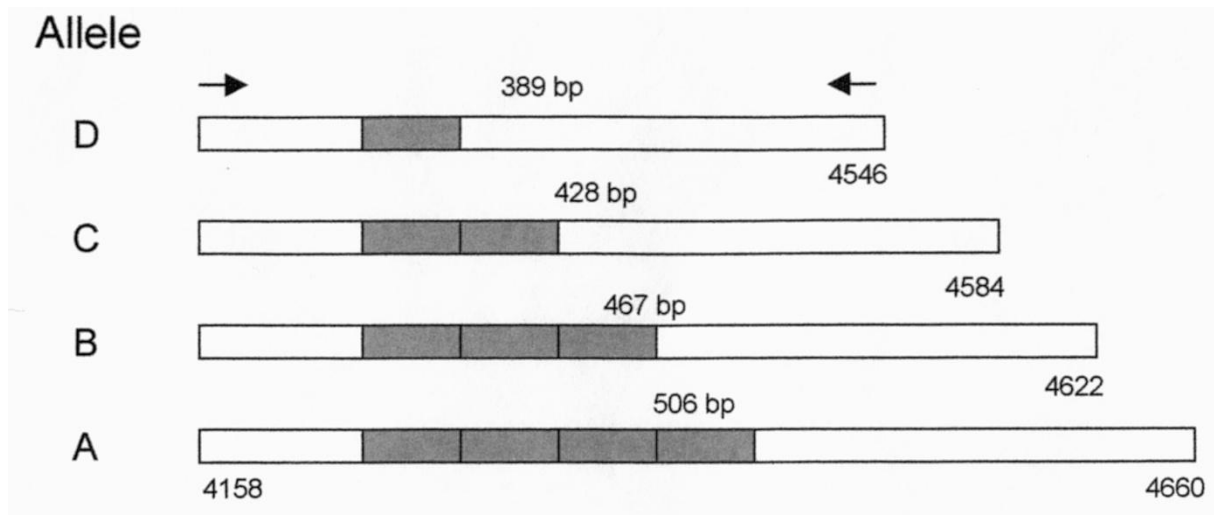


Abb. 3: Die Allele A, B, C, und D des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha

Erklärungen: Jede graue Box stellt einen Repeat aus 39 Basenpaaren dar, welcher dann zu einer Verlängerung der Makroglykopeptidregion des Glykoproteins Ib α (GPIb α) um jeweils 13 Aminosäuren führt. Abkürzungen: bp: Basenpaare, VNTR: variable number of tandem repeats

1.7. Ziel dieser Arbeit

In der vorliegenden Untersuchung sollte an einem Studienkollektiv aus herzgesunden Probanden und Patienten mit KHK und/oder MI untersucht werden, ob der Längenpolymorphismus VNTR des thrombozytären GPIb α einen eigenständigen, unabhängigen Risikoindikator für die KHK und den MI darstellt.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen durch die vorliegende Untersuchung geklärt werden:

1. Sind die bereits bekannten Risikofaktoren wie Alter, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Rauchen, erhöhter Body Mass Index, Hypercholesterinämie, erhöhtes Lipoprotein (a) und Apolipoprotein B sowie erniedrigte Apolipoprotein AI-Werte als Risikofaktoren für die KHK und den MI in der vorliegenden Studienpopulation aus 469 männlichen Kontrollpersonen und 2272 koronarangiographierten, männlichen Patienten nachweisbar?
2. Kann der bekannte Zusammenhang zwischen KHK und MI in der untersuchten Studienpopulation nachvollzogen werden?

3. Stellt der Längenpolymorphismus VNTR des GP $Ib\alpha$ einen unabhängigen, eigenständigen Risikoindikator für die KHK und den MI dar?

2. Material

2.1. Kleinmaterial

Fotopapier:	UPP-110S, 110 mm × 20 m, TYPE I (normal), Sony, Tokyo, Japan
Mikroreaktionsgefäße:	silikonisiert, 1,7 ml, Sorenson Bio Science Inc, Salt Lake City, USA
Mikrotiterplatten:	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen:	(weiß, gelb, blau), Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PCR-Strips:	Strip-Ease 8, Robbins Scientific Corporation, Sunnydale, USA
sterile Pipettenspitzen:	Art Molecular Bio Products, San Diego, USA

2.2. Geräte

Arbeitsbank (steril):	Template Tamer TM , Appligene Oncor, Heidelberg, Deutschland
Autoklav:	Melag Autoklav 23, Melag, Berlin, Deutschland
Behring-Nephelometer:	Behringwerke AG, Marburg, Deutschland
BM/Hitachi 717:	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Elektrophoresekammer:	Keutz, Reiskirchen, Deutschland
Farb-Monitor:	VGA MPR II, 15 Zoll, INTAS, Göttingen, Deutschland
Kamera:	Digit Store Duo 100, INTAS, Göttingen, Deutschland

Mikrowelle:	R-220A, Sharp, Mahwah, New Jersey, USA
Minischlitten:	Keutz, Reiskirchen, Deutschland
Netzgeräte:	DESATRONIC 2000/3000, DESAGA, Heidelberg, Deutschland
Objektiv:	Aufnahme-Zoom-Objektiv 12-75 mm, mit DNA-Sperrfilter, Olympus, Hamburg, Deutschland
PCR-Maschine:	PCR Express, Hybaid, Ashford, Middlesex, England
Pipetten:	(0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000µl), Eppendorf, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Rüttler:	IKA-Vibro-Fix VF 2, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland
Standzylinder:	Schott-Glas, Duran, Mainz, Deutschland
Stativ:	INTAS, Göttingen, Deutschland
Ultrazentrifuge:	Biofuge A, Heraeus Christ, Osterode im Harz, Deutschland
Video-Printer:	Video-Graphic-Printer UP-895 MD, Sony, Tokyo, Japan
UV-Tisch:	UVT 400-M, IBI, Kodak Company, New Haven, USA
Waage:	Mettler AE 100, Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland

2.3. Reagenzien

Agarose:	50-1000 bp, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Apolipoprotein-Kontroll-Serum:	CHD (human), Behringwerke AG, Marburg, Deutschland
Aqua dest:	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Basenpaarleiter:	50 bp DNA-Ladder, GIBCO, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Desoxyribonucleotide (dNTP's):	dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Amersham Pharmacia Biotech Inc, Freiburg, Deutschland
Ethidiumbromid:	GIBCO, BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
GC-rich PCR System:	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Gluco-quant-Reagenz:	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Loading-Puffer:	0,25 % Bromphenolblau, Sigma, Steinheim, Deutschland 40 % Saccharose, Merck, Darmstadt, Deutschland Aqua dest, Baxter, Unterschleißheim, Deutschland 0,5 M EDTA, Merck, Darmstadt, Deutschland
N Antiserum gegen Apo AI:	N Antiserum gegen Human- Apolipoprotein AI, Behringwerke, Marburg, Deutschland

N Antiserum gegen Apo B:	N Antiserum gegen Human-Apolipoprotein B, Behringwerke AG, Marburg, Deutschland
N Apolipoprotein-Standard-Serum:	Human, Behringwerke AG, Marburg, Deutschland
N Latex Lp (a) Reagenz:	Behringwerke AG, Marburg, Deutschland
N Lp (a)-Kontroll-Serum:	SY (human), Behringwerke AG, Marburg, Deutschland
N Lp (a)-Standard-Serum:	SY (human), Behringwerke AG, Marburg, Deutschland
TBE-Puffer:	0,44 M Tris, Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland 0,44 M Borsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland 2 mM EDTA, Merck, Darmstadt, Deutschland Aqua dest, Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Testkit zur Cholesterin-Bestimmung:	Cholesterin CHOD-PAP, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Testkit zur Triglyzerid-Bestimmung:	Triglyceride GPO-PAP, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

2.4. *Primer*

Vorwärts-GPIba-Primer:

(Position 4158-4177), 5` - ACA-
CTT-CAC-ATG-GAA-TCC-AT -
3` MWG-Biotech AG, Ebersberg,
Deutschland

Rückwärts-GPIba-Primer:

(Position 4546-4527), 5` - GGG-
TCA-TTT-CTG-GAG-CTC-TC -
3` MWG-Biotech AG, Ebersberg,
Deutschland

3. Methodenteil

3.1. *Charakterisierung der Studienpopulation*

Mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR: Polymerase Chain Reaction) wurde der Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ (VNTR) des thrombozytären Glykoproteins Ib α (GPIb α) in DNA-Proben von 469 herzgesunden, männlichen Kontrollpersonen und 2272 männlichen Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) bzw. mindestens einem überlebten Myokardinfarkt (MI) analysiert. Zur Teilnahme an der Studie erklärten die Probanden ihr mündliches Einverständnis.

Die Kontrollgruppe bestand aus 469 klinisch herzgesunden, männlichen Personen. Diese Gruppe setzte sich aus Blutspendern vom Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie Patienten der chirurgischen Abteilungen und Einwohnern aus Gießen zusammen. Bei den Kontrollpersonen wurde mittels des strukturierten Rose Fragebogens (Rose, 1962) untersucht, ob diese a) einen MI oder Angina pectoris in der Anamnese hatten, b) Symptome aufwiesen, die auf eine Angina pectoris hinwiesen und c) einen Schlaganfall oder ein anderes vaskuläres Ereignis in der Anamnese vorlag.

Bei den Patienten handelte es sich um 2272 männliche Patienten der Abteilung für Kardiologie und Angiologie des Medizinischen Fachbereiches an der Justus-Liebig-Universität Gießen und der kardiologischen Abteilung der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim. Sämtliche Patienten unterzogen sich entweder in Gießen oder in Bad Nauheim einer diagnostischen Koronarangiographie. Bei ca. 80% der Patienten erfolgte die Koronarangiographie aufgrund einer vermuteten bzw. nachgewiesenen KHK. Bei den restlichen 20 % wurde die Koronarangiographie zur Abklärung einer reduzierten linksventrikulären Funktion durchgeführt (18 % länger bestehende arterielle Hypertonie, 2 % andere Ursachen wie z.B. dilatative Kardiomyopathie). Die Proben der herzgesunden Probanden und der Patienten mit KHK bzw. MI wurden von Januar 1994 bis Juli 1998 gesammelt.

Bei der stationären Aufnahme wurde eine Anamnese bezüglich der klassischen Risikofaktoren bei den Patienten durchgeführt, die Fragen zu folgenden Punkten umfasste: Nikotinkonsum, Hypertonus, Diabetes mellitus, Gefäßerkrankungen in der

Familienanamnese, Vorerkrankungen, Angina pectoris und MI sowie medikamentöse und/oder andere Therapien. Der Zigarettenverbrauch wurde durch die „pack years“ quantifiziert (1 pack year entspricht z.B. 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr) bzw. durch Rauchen und Nicht-Rauchen definiert. Arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus wurden als binäre Variablen ohne eine weitere Unterteilung in Subgruppen definiert. Ein Hypertonus lag vor, wenn dieser bereits diagnostiziert worden war, oder Werte über 140/90 mmHg an zwei aufeinanderfolgenden Tagen gemessen wurden. Zur Berechnung des Body-Mass-Index (BMI: kg/m^2) wurden Größe (in Meter) und Gewicht (in kg) ermittelt und der BMI nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Body Mass Index} = \text{BMI} = \text{Körpergewicht} / \text{Körpergröße}^2$$

Normbereich:	BMI	20-25 kg/m^2
Adipositas Grad 1:	BMI >	25-30 kg/m^2
Adipositas Grad 2:	BMI >	30-40 kg/m^2
Adipositas Grad 3:	BMI >	40 kg/m^2

Bei den Therapien wurden Interventionen wie z.B. eine perkutane transluminale Angioplastie (PTCA) und/oder eine aortokoronare Bypassoperation bei den Patientendaten berücksichtigt. Bei einem MI in der Anamnese wurden Anzahl und Lokalisation des Infarktes/der Infarkte, sowie das Lebensalter bei Auftreten des Infarktes notiert. Durch alte Patientenakten, Arztbriefe und Untersuchungsergebnisse (EKG, Laborbefunde, Echokardiographie, Szintigramme und Koronarangiographien) wurden die Patientenangaben verifiziert.

3.2. Diagnostik der koronaren Herzkrankheit

Bei der KHK sind die Koronargefäße durch atherosklerotische Ablagerungen verengt, was die Sauerstoffversorgung des Myokards vermindert. Besonders durch körperliche Belastung kommt es zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf. In der Abteilung für Kardiologie und Angiologie des Medizinischen Fachbereiches der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie der kardiologischen Abteilung der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim wurden der MI sowie die Angina pectoris nach den WHO-

Kriterien unter zur Hilfenahme von Anamnese, EKG, Belastungs-EKG, Echokardiographie etc. diagnostiziert. Bei den WHO-Kriterien für den MI müssen mindestens zwei der folgenden drei Kriterien vorhanden sein: a) ST-Strecken-Hebung um mindestens 1 mm in zwei oder mehr aufeinander folgenden Ableitungen, b) typischer Brustschmerz mit einer Dauer von mindestens 20 Minuten, c) Erhöhung der Kreatinphosphokinase auf mehr als das zweifache des Basalwertes (Braunwald, 1989). Die Koronarangiographie wurde in Linksherzkathetertechnik nach der Judkins-Methode durchgeführt. Nach der Seldinger-Technik wurde ein peripheres größeres Gefäß (Arteria femoralis dextra) perkutan punktiert, durch die liegende Kanüle ein elastischer Führungsdraht in das Gefäß gelegt, die Kanüle entfernt und drei röntgenpositive, verschieden geformte Katheter über den Führungsdraht unter Durchleuchtungs-, Blutdruck- und EKG-Kontrolle in das Gefäßsystem geschoben. Die Katheter wurden zur Ventrikulographie und zur Sondierung der linken und rechten Koronararterie benutzt. Der Katheter wurde bis zum Abgang der Nierenarterien vorgeschoben und dort luft- und blutfrei gespült. Es wurden die linksventrikulären Drücke gemessen. Für die Ventrikulographie wurde Kontrastmittel injiziert und röntgenologisch die enddiastolische und endsystolische Größe des linken Ventrikels bestimmt sowie die globale und regionale Myokardkontraktion und eine eventuelle Mitralklappeninsuffizienz beurteilt. Zur Koronariendarstellung wurden unter Kontrastmittelinjektion zeitgleich Röntgenaufnahmen in einer oder zwei Ebenen mit einer 35-mm-Filmkamera angefertigt. Jede Koronararterie wurde in mehreren rechtsanterioren (RAO: Right Anterior Oblique, 30°) und linksanterioren (LAO: Left Anterior Oblique, 60°) Projektionen und axialen und hemiaxialen Ebenen aufgenommen. Am Ende der Untersuchung wurde zur Blutstillung ein Druckverband für 24 Stunden an der Injektionsstelle angelegt.

Als erkrankte Koronararterien wurden diejenigen Gefäße bezeichnet, die einen Stenosegrad von > 50 % aufwiesen. Die KHK wurde zum einen durch die Einteilung in Ein-, Zwei- und Drei-Gefäßerkrankung und zum anderen durch den Gensini-Score (Gensini, 1983) charakterisiert. Die Einteilung in Null-, Ein-, Zwei- oder Dreigefäßerkrankung hängt von der Stenoselokalisation ab, wobei z.B. bei einer Dreigefäßerkrankung beide Äste der linken (Ramus circumflexus, Ramus interventricularis anterior) sowie die rechte Koronararterie (Arteria coronaria dextra) betroffen sind.

Wie Selzer (Selzer, 1982) feststellte, erlaubt die Einteilung in Ein-, Zwei-, Dreigeßäßerkrankungen nur eine ungenaue und grobe Charakterisierung des Schweregrades der KHK. Eine genauere Klassifizierung des Schweregrades unter Berücksichtigung aller Koronararterienabschnitte wurde von Gensini publiziert (Gensini, 1983).

Gensini berücksichtigte den geometrisch zunehmenden Schweregrad der Läsionen, den kumulativen Effekt multipler Läsionen, die Signifikanz der Lokalisationen, den modifizierenden Einfluss von Kollateralen, die Größe und Qualität der distalen Gefäße sowie den Status der myokardialen Funktion (Gensini, 1983).

Dabei wird nach Gensini dem Ausmaß der Verengung der jeweiligen Koronaräste ein „Severity Score“ zwischen 1 und 32 zugewiesen (z.B. 25 % = 1, 100 % = 32) (Tab. 1, Abb. 4). Stenosen unter 25 % gelten als Wandunregelmäßigkeiten und werden bei der Definition des Gensini-Scores nicht berücksichtigt. Abhängig von der Bedeutung des betroffenen Abschnittes für die Herzfunktion wird der Severity Score mit dem Faktor 0,5, 1, 1,5, 2,5 oder 5 multipliziert (Tab. 2). So würde der Severity Score einer 50 %-igen Stenose des Hauptstamms der linken Koronararterie mit dem Faktor 5 multipliziert (Tab. 2, Abb. 5). Besteht eine Atherosklerose in mehreren Abschnitten der Koronararterien, addieren sich die einzelnen Scores zu einem Gesamt-Score.

Tab. 1: Gegenüberstellung von Stenosegrad und entsprechendem „Severity Score“ nach Gensini

Grad der Stenose	Severity Score
< 25 %	1
26-50 %	2
51-75 %	4
76-90 %	8
91-99 %	16
100 %	32

**Tab. 2: Angabe der Multiplikationsfaktoren für die jeweiligen
Koronararterienabschnitte nach Gensini**

Faktor 0,5	zweiter diagonaler Ast des Ramus interventricularis anterior und distaler Anteil der Rami posteriores ventriculi sinistri der linken Koronararterie
Faktor 1	Alle Äste der rechten Koronararterie, alle Äste des Ramus circumflexus und apikaler Anteil des Ramus interventricularis der linken Koronararterie
Faktor 1,5	Mittlerer Anteil des Ramus interventricularis der linken Koronararterie
Faktor 2,5	Proximaler Anteil der linken Koronararterie
Faktor 5	Hauptstamm der linken Koronararterie

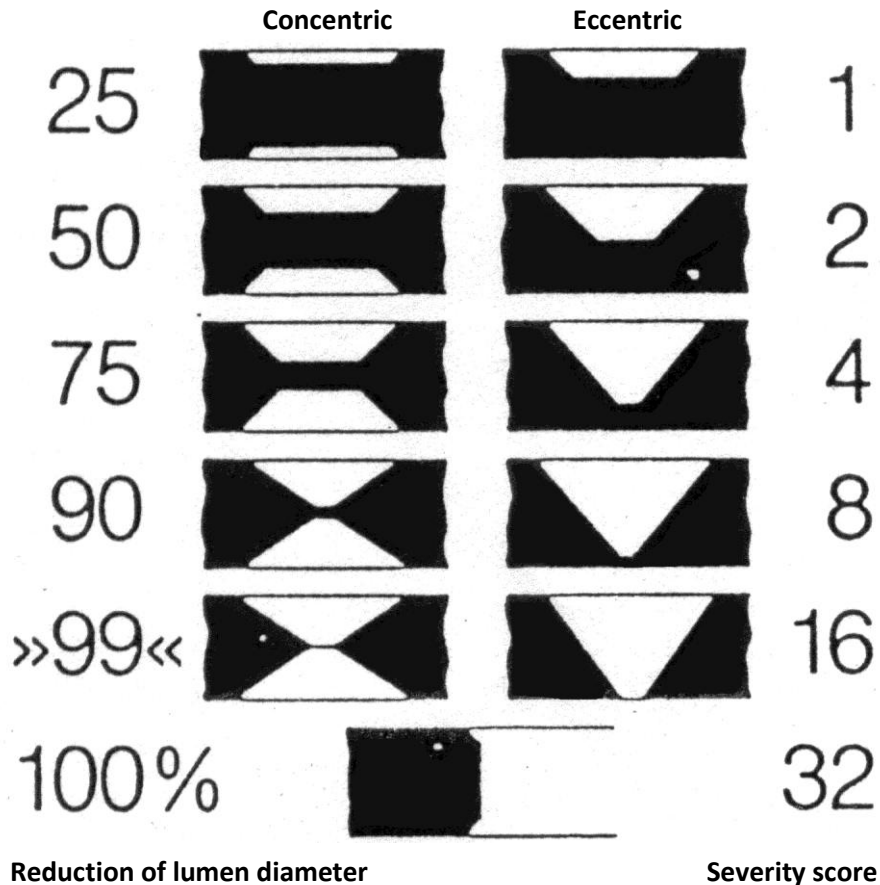


Abb. 4: Gegenüberstellung von radiologisch sichtbaren Koronararterienverengungen und entsprechendem „Severity Score“

Darstellung der konzentrischen und exzentrischen Plaques gemäß dem koronarangiographischen Befund. Stenosen ab 25 % werden bei der Definition des Gensini-Scores berücksichtigt. Rechts steht der „Severity Score“, welcher die relative Schwere der Stenose angibt. Dieser beginnt mit 1 für eine 25 %-ige Stenose, und verdoppelt sich mit zunehmender Verengung der betroffenen Koronararterien. (Aus: Goffredo Gensini: A More Meaningful Scoring System for Determining the Severity of Coronary Heart Disease, American Journal of Cardiology, 1983)

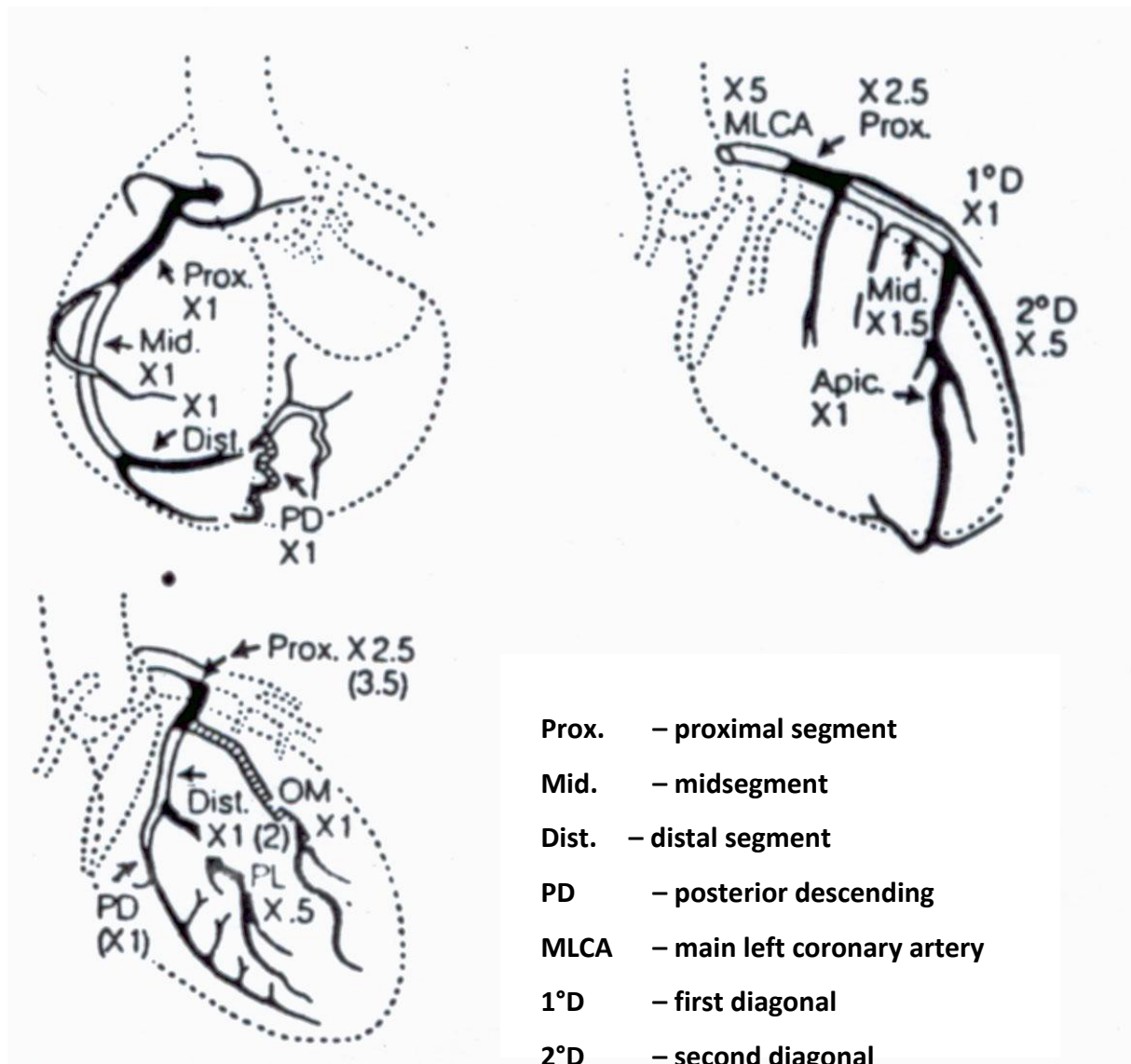


Abb. 5: Abschnitte der Koronararterien mit den jeweiligen Multiplikationsfaktoren

In Abhängigkeit von der funktionellen Bedeutung werden den verschiedenen Segmenten der Koronararterienäste Multiplikationsfaktoren zugeordnet, die von 0,5 bis 5 reichen. Der in Tab. 1 und Abb. 4 dargestellte Stenosegrad („Severity Score“) wird jeweils mit dem segmentspezifischen Faktor multipliziert. Sind mehrere Abschnitte der Koronararterien betroffen, so addieren sich die jeweiligen Zahlen zu einem Gesamt-Score. Erklärung: links oben: rechte Koronararterie (Arteria coronaria dextra), rechts oben: Aus der linken Koronararterie (Arteria coronaria sinistra) entspringender Ramus interventricularis anterior, links unten: Ramus circumflexus der linken Koronararterie. (Aus: Goffredo G Gensini: A More Meaningful Scoring System for Determining the Severity of Coronary Heart Disease, American Journal of Cardiology, 1983)

3.3. Messung von etablierten Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit und des Myokardinfarktes

Allen Patienten und Kontrollpersonen wurde EDTA-Blut zur DNA-Isolierung sowie Serum- und Plasmaproben für die klinisch-chemischen Untersuchungen abgenommen.

3.3.1. TRIGLYZERIDE

Die Triglyzeride sind aufgrund ihres Mangels an polaren Gruppen schlecht wasserlöslich und müssen im Blut an Proteine gekoppelt transportiert werden. Die mit der Nahrung aufgenommenen Triglyzeride werden im Darm von der Pankreaslipase hydrolytisch gespalten, resorbiert und in der Darmwand zu Triglyzeriden resynthetisiert. Triglyzeride werden v.a. an Chylomikronen und VLDL (Very Low Density Lipoprotein) gebunden transportiert (Sandhofer, 1994). Triglyzeride dienen als Energielieferant.

Referenzwerte: Serum: > 16 Jahre: 50-180 mg/dl
> 50 Jahre: 55-245 mg/dl

Klinische Relevanz: In mehreren Studien (Framingham Heart Study, Stockholm Heart Study, Paris Prospective Heart Study) (Schwandt, 1990), PROCAM Study (Assmann, 1994) konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit erhöhten Triglyzeridwerten eine höhere Inzidenz der KHK aufwiesen (Schwandt 1990/ Assmann, 1994). Dabei ist noch nicht völlig geklärt, ob Triglyzeride als Marker für triglyzeridreiche Lipoproteine einen unabhängigen Risikofaktor für die Atherosklerose darstellen oder über eine Erniedrigung des HDL-Cholesterins (High Density Lipoprotein) indirekte atherogene Wirkung haben (Gaziano, 1997/ Geurian, 1992).

Bestimmungsmethode: Für die Triglyzeridbestimmung wurde der klinisch-chemische Analysator Hitachi 717 (Boehringer, Mannheim, Deutschland) verwandt. Bei der enzymatischen GPO-PAP-Reaktion wurden die Triglyzeride zu Glycerin hydrolysiert und anschließend zu Dihydroacetonphosphat und Wasserstoffperoxid oxidiert. Das Wasserstoffperoxid (Abb. 6) bildete unter Einwirkung der Peroxidase mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol einen roten Farbstoff, der photometrisch bestimmt wurde und dessen Farbintensität der Triglyzeridkonzentration direkt proportional war.

3 µl Serum wurden mit 250 µl des folgenden Reaktionsgemischs (Tab. 3) versetzt und bei 700 nm Wellenlänge die Intensität des roten Farbstoffes gemessen.

Die Reaktion lief nach folgenden Gleichungen ab:

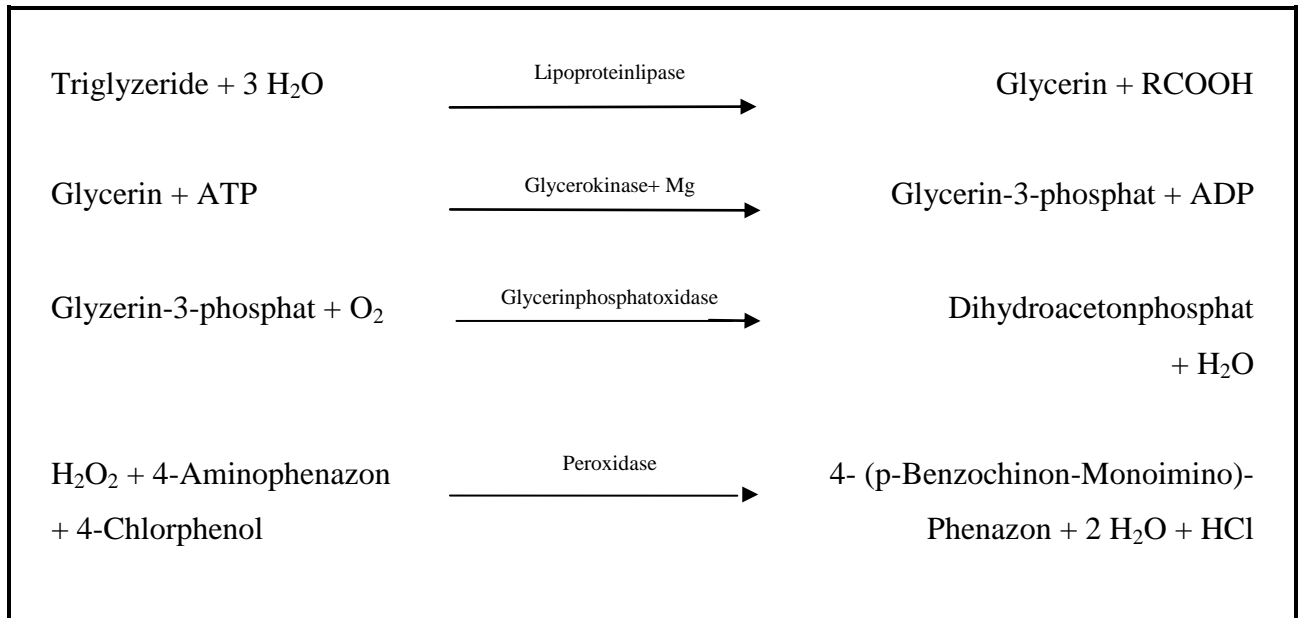


Abb. 6: Reaktionsgleichungen zur Bestimmung der Triglyzeridkonzentration im Serum

Abkürzungen: RCOOH: freie Fettsäure

Tab. 3: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Bestimmung der Triglyzeridkonzentration im Serum

PIPES-Puffer	50 mmol/l, pH 6,8
Mg ⁺⁺	40 mmol/l
Natriumcholat	0,20 mmol/l
ATP	≥ 1,4 mmol/l
4-Aminophenazon	≥ 0,13 mmol/l
4-Chlorphenol	4,7 mmol/l
Kaliumhexacyanoferrat (II)	1 µmol/l
Fettalkohlglykolether	0,65 %
Lipoproteinlipase	≥ 5,0 U/ml
Glycerokinase	≥ 0,19 U/ml
Glycerinphosphatoxidase	≥ 2,5 U/ml
Peroxidase	≥ 0,10 U/ml

Abkürzungen und Erklärungen: Glycerinphosphatoxidase aus *E. coli*; Glycerokinase aus *Bacillus stearothermophilus*; Lipoproteinlipase aus *Pseudomonas* species; Peroxidase aus Meerrettich; PIPES-Puffer: Piperazin-1,4-bis(2-Ethansulfonsäure)

3.3.2. CHOLESTERIN

Cholesterin gibt es nur in menschlichen und tierischen Organismen. Dort ist es Bestandteil von z.B. Zellmembranen, Myelinscheiden, Lipoproteinen sowie eine biosynthetische Vorstufe von Steroidhormonen und Gallensäuren. Normalerweise ist die durch die Nahrung aufgenommene Cholesterinmenge geringer als die durch endogene Neusynthese gebildete. Ein Schlüsselenzym der Cholesterin-Biosynthese ist die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase). Das Cholesterin wird an Lipoproteine gebunden und mit Fettsäuren verestert transportiert: nach der Resorption im Darm in Chylomikronen, ansonsten in LDL (Low Density Lipoprotein), VLDL und HDL (Sandhofer, 1994). Die Veresterung erfolgt intravaskulär durch das Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), welches u.a. durch Apolipoprotein AI (Apo AI) aktiviert wird.

Referenzwerte: Serum (nach 10 h Nahrungskarenz): 120-220 mg/dl

Klinische Relevanz: Eine Hypercholesterinämie ist zum Teil ernährungsbedingt, kann aber auch im Rahmen einer angeborenen Hyperlipoproteinämie auftreten. In der Framingham Studie stellte der Wert des Gesamtcholesterins einen guten Vorhersagewert für das Auftreten der KHK bei unter 50-Jährigen dar (Castelli, 1986).

Bei den über 50-Jährigen ließ sich eine genauere Vorhersage des Risikos für die KHK durch die Bestimmung von LDL, VLDL und HDL treffen (Castelli, 1986). Auch Assmann et al. fanden erhöhte Cholesterinwerte bei Patienten mit einer KHK (Assmann, 1994). In einem anderen Teil der Framingham Studie wurden die Patienten untersucht, welche bereits einen Myokardinfarkt überlebt hatten (Wong, 1991). Hier zeigte sich ein erhöhtes Risiko für einen Re-Infarkt bzw. Tod durch KHK bei einem erhöhten Gesamtcholesterin (Wong, 1991).

Bestimmungsmethode: Zur Messung der Cholesterinserumkonzentration wurde der klinisch-chemische Analysator Hitachi 717 (Boehringer, Mannheim, Deutschland) genutzt. Die Cholesterinkonzentration wurde enzymatisch mit der CHOP-PAP-Methode bestimmt. Cholesterinester wurde durch die Cholesterinesterase in freies Cholesterin und Fettsäuren gespalten. Zusammen mit Sauerstoff wurde das Cholesterin zu Δ^4 -Cholestenon und Wasserstoffperoxid umgewandelt. Das entstandene Wasserstoffperoxid (Abb. 7) bildete mit 4-Aminophenazon und Phenol unter Wirkung der Peroxidase einen roten Farbstoff, der photometrisch bestimmt wurde, und dessen Farbintensität direkt proportional zur Cholesterinkonzentration war. Es wurden 3 μ l Serumvolumen mit 250 μ l des folgenden Cholesterinreagenzes (Tab. 4) gemischt. Die photometrische Messung des roten Farbstoffes erfolgte bei einer Wellenlänge von 700 nm.

Die Reaktion lief nach folgenden Gleichungen ab:

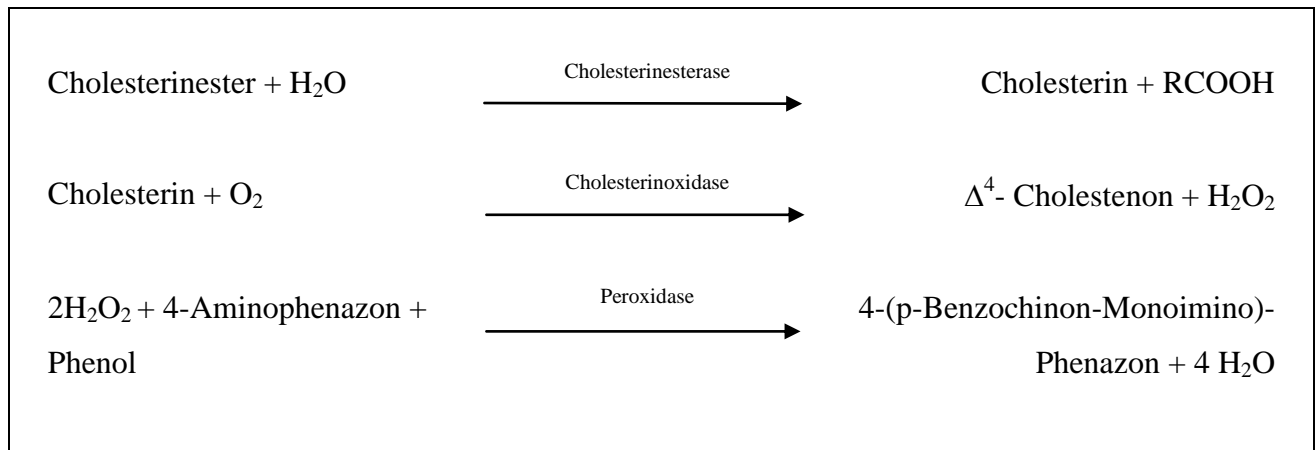


Abb. 7: Reaktionsgleichungen zur Bestimmung der Cholesterinkonzentration im Serum

Abkürzungen: RCOOH: freie Fettsäure

Tab. 4: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Bestimmung der Cholesterinkonzentration im Serum

PIPES-Puffer	75 mmol/l, pH 6,8
Mg ⁺⁺	10 mmol/l
Natriumcholat	0,2 mmol/l
4-Aminophenazon	≥ 0,15 mmol/l
Phenol	≥ 4,2 mmol/l
Fettalkoholglycoether	1 %
Cholesterinesterase	≥ 0,5 U/ml
Cholesterinoxidase	≥ 0,25 U/ml
Peroxidase	≥ 0,25 U/ml

Abkürzungen und Erklärungen: Cholesterinesterase aus *Pseudomonas* species; Cholesterinoxidase aus *E.coli*; Peroxidase aus Meerrettich; PIPES-Puffer: Piperazin-1,4-bis (2-Ethansulfonsäure)

3.3.3. *APOLIPOPROTEIN AI UND APOLIPOPROTEIN B*

Das Apolipoprotein B (Apo B) ist mit ca. 95 % das Hauptprotein des LDL. Apo B und LDL bilden zusammen das Lipoprotein B.

Referenzwerte: Apo B: Männer: 0,7-1,6 g/l
Frauen: 0,6-1,5 g/l

Klinische Relevanz: Das LDL besitzt für die Atherogenese eine spezielle Bedeutung. Das in der Intima vorhandene oxidierte LDL (Berliner, 1995) wird durch das Apo B über spezifische Zellrezeptoren der Makrophagen gebunden und mitsamt dem Rezeptor in diese aufgenommen („internalisiert“). Die Makrophagen phagozytieren das LDL, was zur Bildung von Schaumzellen führt, einem wichtigen Schritt in der Entstehung der Atherogenese (Sandhofer, 1994/ Homma, 2004). Außerdem verursacht das oxidierte LDL eine Entzündung, welche das Voranschreiten der Atherosklerose begünstigt (Homma, 2004).

Das Apolipoprotein AI (Apo AI) stellt mit ca. 65 % den Hauptanteil des HDL dar (Srivastava, 2000). Die LCAT katalysiert die Veresterung von Cholesterin und wird, wie bereits oben erwähnt (3.3.2.), durch Apo AI aktiviert. Das veresterte Cholesterin kann zur Leber transportiert und dort zum Teil zu Gallensäuren umgewandelt und ausgeschieden werden (Sandhofer, 1994).

<i>Referenzwerte:</i> Apo AI:	Männer:	1,15-1,90 g/l
	Frauen:	1,15-2,20 g/l

Klinische Relevanz: Eine erniedrigte Apo AI-Konzentration stellt einen atherosklerotischen Risikofaktor dar (Luc, 2002/ Francis, 2001), weil dadurch ein Abtransport des Cholesterins aus der Peripherie nicht mehr in genügendem Umfang stattfindet.

In Studien konnte gezeigt werden, dass die Bestimmung von Apo AI (bei Männern) (Sigurdsson, 1992/ Kottke, 1986) und Apo B (bei Frauen und Männern) (Reinhart, 1990) zur Abschätzung des Artheroskleroserisikos eine höhere prognostische Aussagekraft hat als die Bestimmung des Gesamtcholesterins (Reinhart, 1990/ Sigurdsson, 1992/ Kottke, 1986). Als besonders aussagekräftig zur Einschätzung des Atheroskleroserisikos hat sich der Quotient aus Apo AI/Apo B herausgestellt (Reinhart, 1990). Der Vorteil der Apo AI- und Apo B-Bestimmung liegt in der relativen Unabhängigkeit dieser Parameter von der Nahrungsaufnahme (Reinhart, 1990).

Bestimmungsmethode: Für die Bestimmung von Apo AI und Apo B wurde das Nephelometer von Behring (Marburg, Deutschland) verwendet. In einer immunchemischen Reaktion bildeten die Apolipoproteine mit spezifischen Antikörpern Immunkomplexe, an welchen das eingestrahlte Licht gestreut wurde (Prinzip der Nephelometrie). Die Intensität des Streulichts war abhängig von der Konzentration des jeweiligen Apolipoproteins. Zur Auswertung diente ein Standard bekannter Konzentration. Aus patentrechtlichen Gründen können die Zusammensetzungen der Reaktionspuffer und die Konzentrationen der Reaktionspartner zur Bestimmung von Apo AI und Apo B nicht angegeben werden.

3.3.4. LIPOPROTEIN (A)

Das Lipoprotein (a) (Lp (a)) besteht aus dem LDL und dem Apolipoprotein (a) (Apo (a)) (Duriez, 1996/ Riesen, 1991). Über eine Disulfidbrücke sind die zwei Komponenten des Lp (a) miteinander verbunden (Riesen, 1991). Die Serumkonzentration des Lp (a) ist hauptsächlich genetisch festgelegt (Lenzi, 1996/ Jelakovic, 2002): das Apo (a) ist sehr polymorph (Chromosom 6), und es besteht ein Zusammenhang zwischen den einzelnen Apo (a)-Allelen und der Serumkonzentration von Lp (a) (Duriez, 1996). Lipidsenkende Medikamente haben nur einen sehr geringen Einfluss auf die Lp (a)-Konzentration (Riesen, 1991/ Homma, 2004).

Referenzwerte: Serum: < 30 mg/dl

Klinische Relevanz: Das Apo (a) des Lp (a) zeigt eine hohe Strukturhomologie mit Plasminogen (Lenzi, 1996/ Duriez, 1996/ Marcovina, 1999/ Riesen, 1991/ Loscalzo, 1990) und weist auf eine prothrombotische Rolle des Lp (a) hin, während der LDL-Anteil eine atherogene Rolle des Lp (a) vermuten lässt (Duriez, 1996/ Marcovina, 1999). Lp (a) bindet wie Plasminogen an Fibrin (Loscalzo, 1990). Dadurch hemmt Lp (a) die Plasminogen-Aktivierung und die Entstehung von Plasmin und beeinträchtigt so die Fibrinolyse (Chapman, 1994/ Testa, 1999/ Riesen, 1991). Besonders die kleinen Isoformen des Lp (a) sind effiziente Inhibitoren der Plasminogen-Aktivierung (Chapman, 1994/ Angles-Cano, 2001). In Studien (PRIME Study) konnte gezeigt werden, dass ein erhöhtes Serum-Lp (a) vor allem bei gleichzeitig erhöhtem LDL einen Risikofaktor für Angina pectoris und MI darstellt (Luc, 2002). Eine andere Studie zeigte ebenfalls höhere Lp (a)-Werte bei Patienten mit KHK im Vergleich mit herzgesunden

Probanden (Garcia Frade, 1991). Die physiologische Funktion des Lp (a) ist unbekannt. Weder Diät noch lipidsenkende Medikamente beeinflussen die Lp (a)-Konzentration wesentlich (Riesen, 1991), sodass bei Personen mit erhöhtem Lp (a)-Spiegel die Senkung der anderen Risikofaktoren im Vordergrund steht.

Bestimmungsmethode: Für die Lp (a)-Bestimmung wurde das Nephelometer von Behring (Marburg, Deutschland) genutzt. Mit spezifischen Antikörpern beladene Polystyrol-Partikel bildeten mit dem im Serum vorhandenen Lp (a) Aggregate, die einfallendes Licht streuten (Prinzip der Nephelometrie). Dabei hing die Intensität des Streulichtes von der Konzentration des Lp (a) ab. Zur Auswertung diente ein Standard bekannter Konzentration. Aus patentrechtlichen Gründen können die Zusammensetzungen der Reaktionspuffer und die Konzentrationen der Reaktionspartner zur Bestimmung von Lp (a) nicht angegeben werden.

3.3.5. BLUTGLUCOSE

Glucose ist einer der wichtigsten Energielieferanten des Körpers. Aus 1 Mol Glucose entstehen in aeroben Zellen durch Oxidation 38 Mol Adenosintriphosphat (ATP). Vor allem Erythrozyten und das zentrale Nervensystem sind auf Glucose angewiesen. Glucose kann außerdem zur Energiespeicherung in Glykogen und Fett umgewandelt werden.

Referenzwerte: Serum: > 1 Jahr: 70-110 mg/dl

Klinische Relevanz: Diabetiker bzw. Patienten mit einem gestörten Glucosemetabolismus haben ein erhöhtes Risiko, an Atherosklerose und daraus resultierender KHK zu erkranken (Assmann, 1988/ Assmann, 1994/ Folsom, 1997/ Seibaek, 1997). Kommt ein Diabetes mellitus zum übrigen kardiovaskulären Risikoprofil dazu, so steigt das Risiko eines kardialen Ereignisses exponentiell (Grant, 2003). Durch die Hyperglykämie kommt es zu makro- und mikroangiopathischen Veränderungen. Die Arterienwände sind insulinsensitives Gewebe (Stout, 1985 (a)). Bei der Makroangiopathie führt die Hyperinsulinämie beim Typ II Diabetes durch Stimulation der Proliferation der glatten Muskelzellen in den Arterienwänden zur Atherosklerose (Stout, 1985 (a)/ Stout, 1985 (b)), durch Na⁺-Retention und Steigerung des Extrazellulärvolumens zum Hypertonus und durch erhöhte VLDL-Produktion zu Fettstoffwechselstörungen (Stout, 1990). Die Glucoseresistenz beim Typ II Diabetes

führt also zusammen mit der resultierenden Hyperinsulinämie zu einer Gruppe von Veränderungen: erhöhte Triglyzeridwerte, erniedrigtes HDL, Hypertonie, erhöhtes LDL, Hyperurikämie und erhöhte Werte des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors-1 (PAI-1) (Reaven, 1995/ Stout, 1990). Diese Gruppe von Veränderungen, die mit einer Hyperinsulinämie verbunden sind, umfassen das metabolische Syndrom (Reaven, 1995), welches mit einem stark erhöhten Risiko für die KHK assoziiert ist (Reaven, 1995). Bei der Mikroangiopathie kommt es zur KHK, und dort vor allem zur „small vessel disease“, zu zerebralen Durchblutungsstörungen mit transischämischen Attacken sowie Insulten durch thrombembolische Verschlüsse und schließlich zur peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK).

Bestimmungsmethode: Die Glucosekonzentration wurde am klinisch-chemischen Analysator Hitachi 717 bestimmt (Boehringer, Mannheim, Deutschland). Bei der enzymatischen Glucose/Hexokinase-Methode wurde Glucose durch ATP und Hexokinase zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert. Glucose-6-Phosphat wurde in Gegenwart von NADP (Nicotinamid-adeninnucleotidphosphat) durch Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu Gluconat-6-Phosphat oxidiert (Abb. 8). Die Geschwindigkeit der NADPH-Zunahme war direkt proportional zur Glucosekonzentration und wurde photometrisch gemessen. Es wurde 2 µl Serum mit folgenden Reagenzien (Tab. 5) versetzt und die NADPH-Zunahme bei 340 nm Wellenlänge gemessen.

Die Reaktion lief nach folgenden Gleichungen ab:

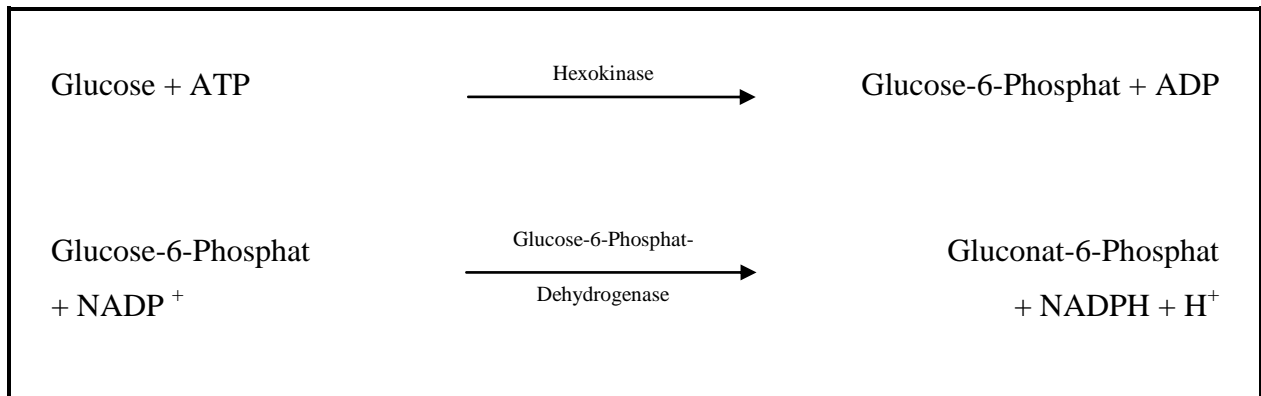


Abb. 8: Reaktionsgleichungen zur Bestimmung der Glucosekonzentration im Serum

NADP: Nicotinamid-adeninnucleotidphosphat (oxidierte Form); NADPH: Nicotinamid-adeninnucleotidphosphat (reduzierte Form)

Tab. 5: Zusammensetzung der Reagenzien zur Bestimmung der Glucosekonzentration im Serum

TRIS-Puffer	100 mmol/l, pH 7,8
Mg ⁺⁺	4 mmol/l
ATP	≥ 1,7 mmol/l
NADP	≥ 1,0 mmol/l
HEPES-Puffer	30 mmol/l, pH 7,0
Hexokinase	8,3 U/ml
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	≥ 15 U/ml

Abkürzungen und Erklärungen: Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus E.coli; HEPES-Puffer: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure; Hexokinase aus Hefe; NADP: Nicotinamidadeninnucleotidphosphat; Tris-Puffer: Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan

3.4. *Bestimmung des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des thrombozytären Glycoproteins I b alpha*

3.4.1. *LEUKOZYTEN-DNA-ISOLIERUNG*

100 µl antikoaguliertes EDTA-Blut (Ethylendiamintetraessigsäure) wurden mit 500 µl TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer) (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) für 10 Sekunden bei $13.000 \times g$ in Eppendorff-Cups zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nochmals mit 500 µl TE-Puffer resuspendiert und erneut bei $13.000 \times g$ zentrifugiert. Nach nochmaligem Dekantieren wurde das Pellet mit 100 µl Lysis-Puffer K (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,1 % Gelatine, 5 % Tween 20, 10 µl frische Proteinase K (10 mg/ml)) gemischt und leicht anzentrifugiert. Für den Verdau der Proteine wurde der Ansatz für 45 min bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K durch Inkubation bei 95 °C für 10 min inaktiviert. Nach Zentrifugation wurden die DNA-Proben in TE-Puffer bei -20 °C aufbewahrt.

3.4.2. *POLYMERASE-CHAIN-REACTION*

3.4.2.1. *Grundprinzip der Reaktion*

1985 entwickelte Mullis die Methode der PCR (Mullis, 1987/ Mullis, 1990/ Schutzbank, 1993), für die er 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt. Mit der PCR als in-vitro-Technik kann man gezielt DNA-Abschnitte mit Hilfe von Taq-Polymerasen, Primern und Desoxynukleotidphosphaten (dNTP's) vervielfältigen. Die Primer sind kurze Nukleotide bestehend aus 16 bis 20 Basenpaaren und flankieren die zu vervielfältigende DNA-Region. Die eigentliche Amplifikation geschieht durch die DNA-Taq-Polymerasen und zugesetzte Desoxynukleotide (dNTP's: Adenin, Guanin, Thymin, Cytosin). Die PCR als zyklisches Verfahren (ca. 25-30 Zyklen) besteht aus den drei sich wiederholenden Schritten der Denaturierung der DNA-Stränge, der Primeranlagerung (Annealing) und der DNA-Synthese (Extension).

Dabei wird die Doppel-Strang-DNA (dsDNA) bei 95 °C zunächst zu Einzelstrang-DNA (ssDNA) denaturiert. Bei der anschließenden Temperaturabsenkung auf ca. 58 °C erfolgt die Primeranlagerung (Annealing) an die DNA-Matrize. Von den Primern als Starthilfe aus erfolgt die DNA-Synthese (Extension) durch die DNA-Polymerasen in 5`-3`-Richtung. Während der ersten beiden Zyklen entstehen DNA-Stränge nicht definierter Länge. Danach wird die DNA-Sequenz gewünschter Länge vermehrt, die man durch die Position der Primer in der Originalmatrize vorgegeben hat. Der Abstand der 5`-Enden der beiden Primer gibt die Länge der PCR-Produkte (Amplicons) vor. Die Vermehrung der DNA durch die PCR geschieht exponentiell.

Mittels Agarose-Gel-Elektrophorese und Ethidiumbromid kann man das PCR-Produkt als Bande sichtbar machen.

3.4.2.2. *Durchführung der Polymerase-Chain-Reaction*

Für die Durchführung der PCR wurde das „GC-Rich-PCR-System“ von Roche (Roche, Diagnostics, Mannheim, Deutschland) verwandt. In einem Reaktionsvolumen von 25 µl befanden sich je 200 nM/l des Vorwärts- und Rückwärts-Primers, 100 ng DNA, je 200 µM/l eines jeden Desoxynucleotidtriphosphats (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 M/l „GC-rich-resolution solution“, 1,5 mM/l MgCl₂ und DMSO, 1U/l Taq-Polymerase mit

3'-5'-Exonuclease Aktivität, 200 µM/l Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM/l KCl, 1 µM/l EDTA, 10 µM/l DTT, 0,005 % Tween 20, 0,005 % Nonidet p40, 0,5 % Glycerol und destilliertes Wasser (Tab. 6). Aus patentrechtlichen Gründen können die Zusammensetzungen und Konzentrationen der Reaktionspartner der „GC-rich-resolution solution“ nicht angegeben werden. Die Primer bestanden aus dem Vorwärtsprimer 5'-ACA-CTT-CAC-ATG-GAA-TCC-AT-3' (Position 4158 -4177) und dem Rückwärtsprimer 5'-GGG-TCA-TTT-CTG-GAG-CTC-TC-3' (Position 4546-4527) (Tab. 7). In der Negativkontrolle wurde statt DNA Aqua dest eingesetzt. Die Amplifikation der DNA erfolgte in dem Thermocycler PCR Express (Hybaid, Ashford, UK). Nach der initialen Denaturierung über 3 min bei 95 °C wurden 35 Zyklen durchgeführt (Denaturierung: 30 sec bei 95 °C, Anneling: 30 sec bei 58 °C, Polymerisation: 45 sec bei 72 °C). Nach einem Nachlauf über 7 min bei 72 °C wurden die Proben anschließend auf 4 °C abgekühlt und bei -20 °C aufbewahrt (Tab. 8).

Tab. 6: Reaktionsgemisch zur Amplifikation der DNA des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“

Reagenzien	Endkonzentration
Sense-Primer	200 nM/l
Antisense-Primer	200 nM/l
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	je 200 µM
DNA	ca. 100 ng
Taq-Polymerase	1 U/l
Tris-HCl	200 µM/l (pH 8,0)
KCl	1 mM/l
EDTA	1 µM/l
DTT	10 µM/l
Tween 20	0,005 %
Nonidet p40	0,005 %
Glycerol	0,5 %
GC-rich-resolution-solution	0,5 M/l
PCR-Puffer (MgCl ₂ + DMSO)	1,5 mM/l
negative Kontrolle	destilliertes autoklaviertes Wasser

Abkürzungen: dATP: Desoxyriboadenosintriphosphat; dCTP: Desoxyribocytidintriphosphat; dGTP: Desoxyriboguanosintriphosphat; DMSO: Dimethylsulfoxid; dNTP: Desoxyribonukleotide; DTT: Dithiothreitol; dTTP: Desoxyribothymidintriphosphat; EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure; PCR: Polymerase-Chain-Reaction; Tris: Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan

Tab. 7: Nukleotidsequenzen der Primer

Vorwärtsprimer (Position 4158-4177)	5`-ACA-CTT-CAC-ATG-GAA-TCC-AT-3`
Rückwärtsprimer (Position 4546-4527)	5`-GGG-TCA-TTT-CTG-GAG-CTC-TC-3`

Abkürzungen : A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin

Tab. 8: Amplifikationsbedingungen der Polymerase-Chain Reaction zum Nachweis des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des thrombozytären Glykoproteins Ib alpha

Initiale Denaturierung bei 93 °C über 3 min			
Programm	Temperatur °C	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95	30 sec	35
Annealing	58	30 sec	35
Polymerisation	72	45 sec	35
Nachlauf bei 72 °C über 7 min			

Abkürzungen: min: Minuten; sec: Sekunden

3.4.3. NACHWEIS DER AMPLIFIZIERTEN DNA MITTELS AGAROSE-GEL-ELEKTROPHORESE

3.4.3.1. Prinzip der Agarose-Gel-Elektrophorese

Das Wort „Elektrophorese“ besteht aus dem griechischen Wort *electron* (= Bernstein, der sich durch Reiben elektrisch aufladen lässt) und dem lateinischen Wort *phore* (= Träger). Elektrophorese bedeutet also das „Tragen“ von Molekülen durch elektrische Ladungen. Nukleinsäuren als negativ geladene Moleküle wandern im elektrischen Feld zur Anode (positive Elektrode). Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von Form und Größe der Nukleinsäuren, der Porengröße des Agarosegels und der angelegten Spannung. Kleinere Nukleinsäuren wandern dabei schneller als große.

3.4.3.2. Durchführung der Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung der amplifizierten DNA erfolgte in 2 %-igen Agarose-Gelen. Dafür wurde 1 g Agarose (Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit 50 ml TBE-Puffer gemischt (TBE-Puffer: 0,44 mol/l Tris; 0,44 mol/l Borsäure; 0,5 M EDTA) und in der Mikrowelle erhitzt. Dem flüssigen Gel wurde Ethidiumbromid (1 µg/ml) zugesetzt.

Anschließend wurde das Gel auf einen Minischlitten (Keutz, Reiskirchen, Deutschland) gegossen und ein Kamm mit 8-10 Taschen eingesetzt. Nach Erstarren des Gels wurde der Minischlitten in die mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (Keutz, Reiskirchen, Deutschland) gelegt und der Kamm vorsichtig entfernt. Für die Auftrennung wurden jeweils 10 µl der DNA-Proben mit 2 µl Loading-Puffer (0,25 % Bromphenolblau, 40 % Saccharose, Aqua dest.) gemischt und in die einzelnen Taschen pipettiert. Zum Ablesen der amplifizierten DNA-Fragmente wurde in die erste Tasche 2 µl des Molekulargewichtsstandards (50bp-Ladder, GIBCO, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und 10 µl Loading-Puffer eingefüllt. In die letzte Tasche wurde die Negativ-Kontrolle – mit Aqua dest statt DNA – eingefüllt. Die Auftrennung erfolgte bei 80 V über 80 Minuten. Durch das zugesetzte Ethidiumbromid konnten die DNA-Banden auf dem UV-Licht-Tisch (UVT 400-M, IBI, Firma Kodak) sichtbar gemacht werden. Die Ergebnisse wurden mit einer Kamera (Digit Store Duo 100, Intas, Göttingen, Deutschland) auf Fotopapier (UPP-110S, Type I (normal), Sony, Tokyo, Japan) dokumentiert. Bei den amplifizierten DNA-Fragmenten waren die A-Allele 506 bp, B-Allele 467 bp, C-Allele 428 bp und D-Allele 389 bp lang (Abb. 9). Die Länge der Allele unterschied sich damit von A über B nach C und D jeweils um 39 Basenpaare.

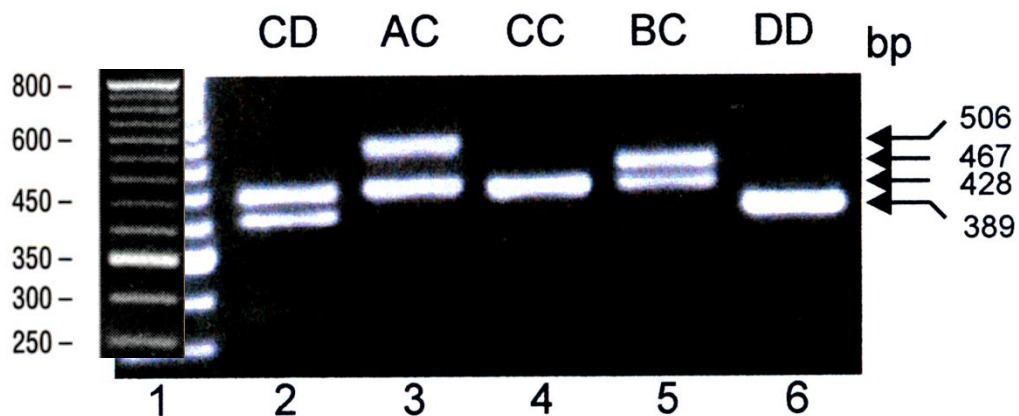


Abb. 9: Darstellung der vier Genotypen anhand zweier homozygoter und drei heterozygoter Probanden.

Abkürzungen und Erklärungen: 1: 50 bp Basenpaarleiter; 2-6: Probanden, rechts Angabe der exakten Längen der einzelnen Genotypen; bp: base pair

3.5. *Definition der Hoch- und Niedrigrisikogruppen*

Durch die Mittelwerte bzw. das Fehlen/ Vorhandensein von etablierten koronaren Risikofaktoren der KHK bzw. des MI konnte die Population in Hoch- und Niedrigrisikogruppen eingeteilt werden. Zu Hochrisikogruppen gehörten also Patienten, die einen Diabetes mellitus und/oder Hypertonus, ein erhöhtes Apo B, ein erniedrigtes Apo AI, ein erhöhtes Lp (a) hatten und/oder Raucher waren. Beim Alter als kontinuierliche Variable wurden die Personen mit einem Alter oberhalb des Mittelwertes der Hochrisikogruppe zugeordnet.

Auch die einzelnen Subpopulationen der Niedrig- und Hochrisikogruppen wurden in Hinblick auf eine Assoziation zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR des thrombozytären GP Iba und der KHK bzw. dem MI untersucht.

3.6. *Statistische Methoden*

Für die statistischen Analysen wurde das Programm SPSS für Windows (Version 11) verwandt. Auf Genotyp-abhängige Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-1-Way Anova (kontinuierliche Variablen) bzw. mittels χ^2 -Test (binäre Variablen) überprüft. Etablierte Risikofaktoren der KHK und des MI wurden mit der multiplen Regressionsanalyse (Schweregrad der KHK, Gensini-Score), oder mit der multiplen logistischen Regression (An-/Abwesenheit von KHK, MI) bestimmt. Ein zweiseitiger p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikanter Unterschied definiert. Die Verteilung von kontinuierlichen Variablen wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Goodness of Fit Test analysiert. Mit Hilfe des χ^2 -Testes wurde die Übereinstimmung der Genotypverteilung mit dem Hardy-Weinberg Gleichgewicht überprüft. Die statistische Beziehung des Längenpolymorphismus VNTR zum Risiko der KHK und des MI wurde mit Hilfe der multiplen logistischen Regression unter Berücksichtigung der etablierten Risikofaktoren bestimmt. Es wurden daher koronare Risikofaktoren, die eine signifikante Assoziation zur KHK zeigten, in die Berechnung mit einbezogen. So genannte Odds ratios wurden zur Einschätzung des jeweiligen Genotyps zum KHK-Risiko oder MI-Risiko berechnet. Für jede Odds ratio wurde ein zweiseitiger p-Wert und ein 95 %-iges Konfidenzintervall unter Berücksichtigung der koronaren Risikofaktoren bestimmt. Potentielle Assoziationen des Längenpolymorphismus VNTR zum Schweregrad der

KHK wurden ebenfalls unter Berücksichtigung koronarer Risikofaktoren mittels multipler Regressionsanalysen untersucht.

4. Ergebnisse

4.1. *Charakterisierung der Studienpopulation*

Die Studienpopulation der vorliegenden Arbeit bestand aus 469 männlichen, herzgesunden Probanden und 2272 männlichen, koronarangiographierten Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) bzw. Zustand nach mindestens einem überlebten Myokardinfarkt (MI). Die herzgesunden Probanden waren Einwohner aus Gießen, Patienten der chirurgischen Abteilungen sowie Blutspender des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Bei der Patientengruppe handelte es sich um koronarangiographierte Personen der Abteilung für Kardiologie und Angiologie des Medizinischen Fachbereiches an der Justus-Liebig-Universität Gießen und der kardiologischen Abteilung der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim.

Bei der gesamten Studienpopulation wurde mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR: Polymerase Chain Reaction) der Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ (VNTR) des thrombozytären Glykoproteins $\text{Ib}\alpha$ ($\text{GPIb}\alpha$) analysiert.

Aufgrund der durchgeführten Koronarangiographie bei allen 2272 Patienten konnten diese in vier Gruppen eingeteilt werden: Gruppe I ($n = 529$) ohne Gefäßerkrankung, d.h. ohne radiologisch nachweisbare Veränderungen der Gefäße oder mit Koronarstenosen $<50\%$ (0-Gefäßerkrankung), Gruppe II ($n = 472$) mit einer 1-Gefäßerkrankung, Gruppe III ($n = 501$) mit einer 2-Gefäßerkrankung und Gruppe IV ($n = 770$) mit einer 3-Gefäßerkrankung (Definition der 0-3-Gefäßerkrankung: siehe 3.2.).

Zudem konnte die Patientengruppe in eine Gruppe ohne MI ($n = 1196$) und eine Gruppe mit mindestens einem überlebten MI ($n = 1076$) eingeteilt werden.

Das Altersspektrum der Gesamtpopulation (Abb. 10) reichte von 17 bis 88 Jahren, wobei das Durchschnittsalter bei $60,5 \pm 10,2$ Jahren lag. Die Gruppe der Kontrollpersonen hatte ein Durchschnittsalter von $55,1 \pm 10,3$ Jahren. Die Gruppe der Patienten mit einer KHK (1- bis 3-Gefäßerkrankung) waren im Durchschnitt $62,7 \pm 9,2$ Jahre alt. Diese Gruppe ließ sich wie folgt weiter unterteilen: bei Patienten ohne KHK (0-Gefäßerkrankung) lag das Durchschnittsalter bei $55,1 \pm 10,3$ Jahren, bei 1-Gefäßerkrankung bei $61,0 \pm 9,7$ Jahren, bei 2-Gefäßerkrankung bei $62,4 \pm 9,6$ Jahren und bei 3-Gefäßerkrankung bei $63,9 \pm 8,5$ Jahren.

Patienten ohne MI hatten ein Durchschnittsalter von $55,2 \pm 10,3$ Jahren, und die MI-Patienten ein durchschnittliches Alter von $62,1 \pm 9,5$ Jahren.

Zur genaueren Einteilung der KHK diente der Gensini-Score (Gensini, 1983) (Definition siehe 3.2.). Dieser lag im gesamten Patientenkollektiv zwischen 0 und 289 bei einem Mittelwert $47,9 \pm 45,2$. Patienten ohne eine KHK (0-Gefäßerkrankung) hatten im Durchschnitt einen Gensini-Score von $5,1 \pm 5,8$, solche mit einer 1-Gefäßerkrankung einen Gensini-Score von $28,4 \pm 19,0$, bei einer 2-Gefäßerkrankung lag der Gensini-Score bei $50,2 \pm 30,8$ und bei einer 3-Gefäßerkrankung bei $87,9 \pm 45,6$ (Abb. 11).

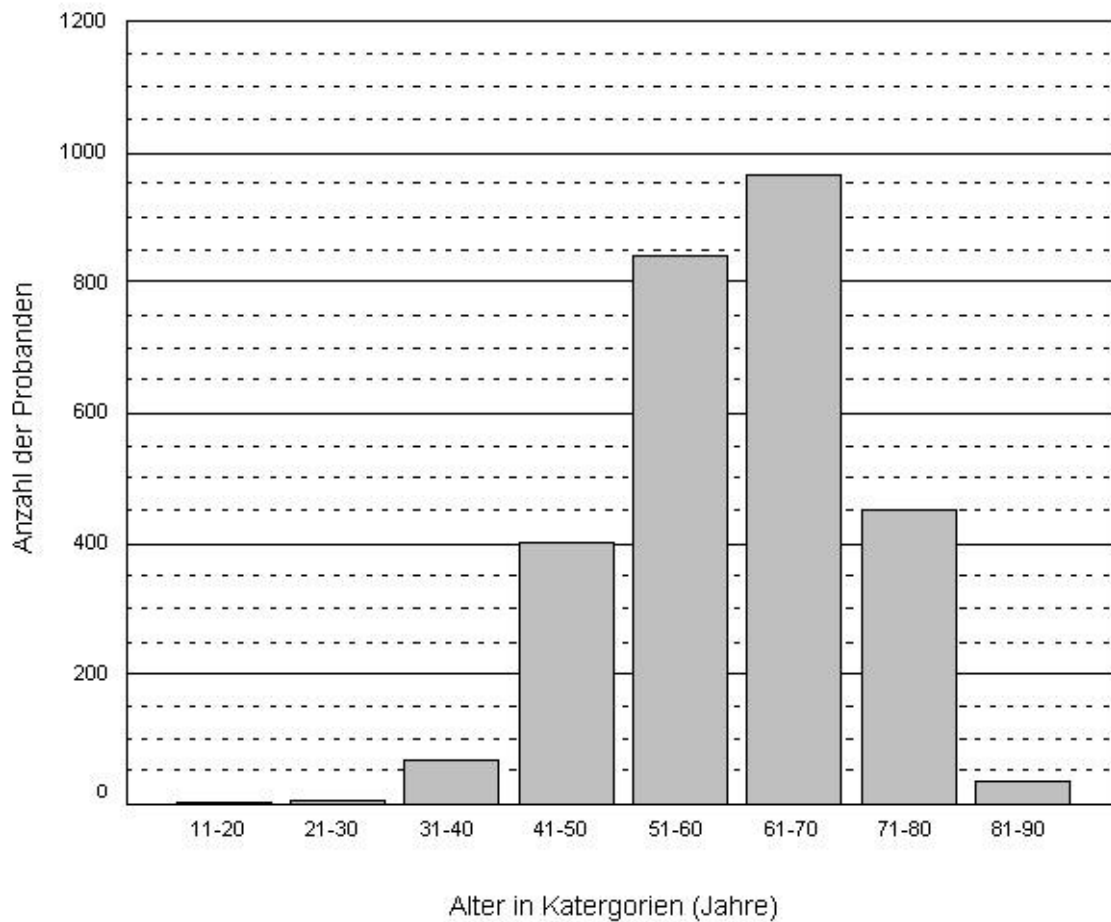


Abb. 10: Einteilung der Gesamtpopulation in Altersdekaden

Wie zu erwarten war der größte Teil der Patienten und Kontrollpersonen zwischen 50 und 70 Jahre alt (65,2 % der Patienten und Kontrollpersonen). 3 Personen waren zwischen 11-20 Jahre alt (0,1 %), 7 Personen zwischen 21-30 Jahre (0,3 %), 67 Personen zwischen 31-40 Jahre (2,4 %), 400 Personen zwischen 41-50 Jahre (14,6 %), 828 Personen zwischen 51-60 Jahre (30,2 %), 956 Personen zwischen 61-70 Jahre (34,9 %), 447 Personen zwischen 71-80 Jahre (16,3 %), und 33 zwischen 81-90 Jahre (1,2 %)

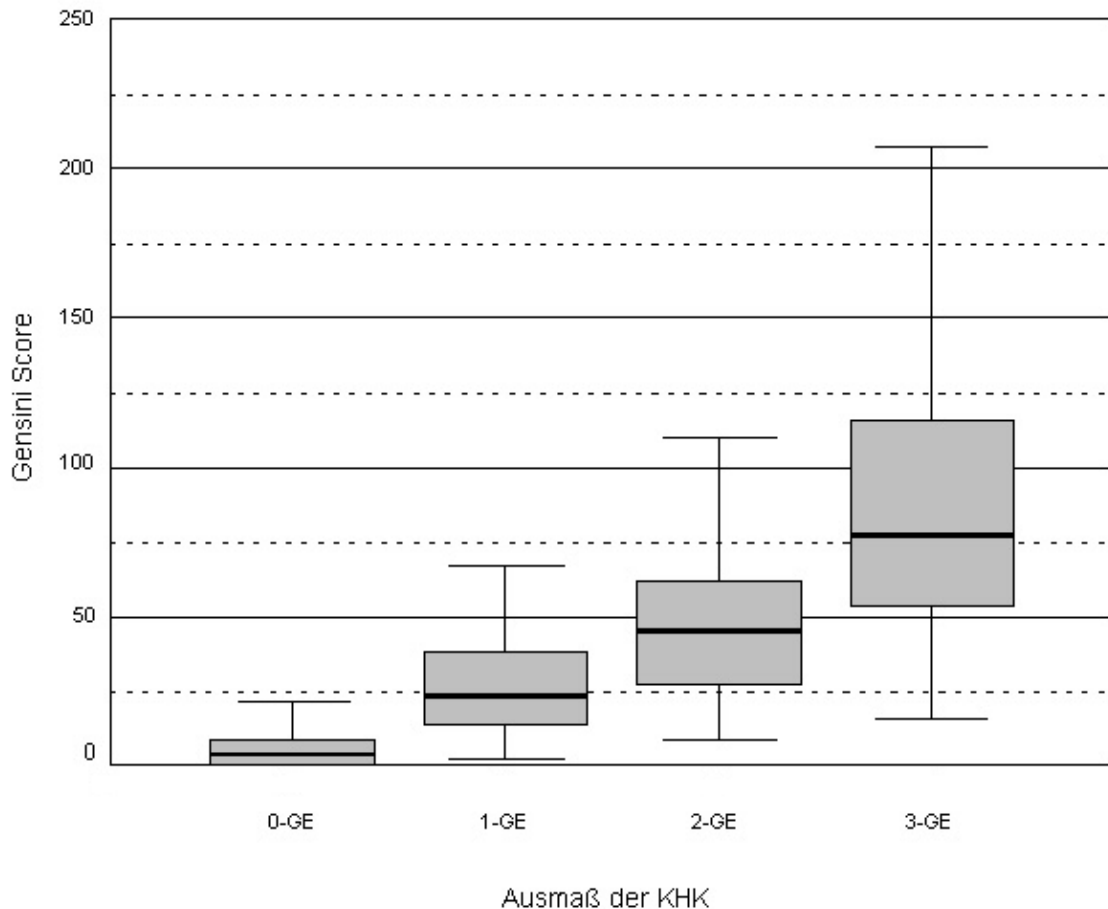


Abb. 11: Gensini-Score in Abhängigkeit von der koronaren Herzkrankheit

Der jeweilige Median des Gensini-Scores ist als schwarzer Balken dargestellt. Die 75ste Perzentile liegt am oberen, die 25ste Perzentile am unteren Kästchenrand. Wie zu erwarten steigt der Gensini-Score mit der Anzahl der erkrankten Gefäße. Abkürzungen: GE: Gefäßerkrankung; 0- bis 3-Gefäßerkrankung: Ausprägung der koronaren Herzkrankheit; KHK: koronare Herzkrankheit

4.2. Verhältnis zwischen koronarer Herzkrankheit und Lebensalter

Die Patientengruppe konnte eingeteilt werden in solche mit einer nachgewiesenen KHK (1-, 2- oder 3-Gefäßerkrankung) ($n = 1743$, Durchschnittsalter $62,7 \pm 9,2$ Jahre) und solche ohne KHK (0-Gefäßerkrankung) ($n = 529$, Durchschnittsalter $55,1 \pm 10,3$ Jahre). Dabei nahm der prozentuale Anteil der Patienten mit einer nachgewiesenen KHK in jeder Alterskategorie kontinuierlich zu (Abb. 12). In der Alterskategorie der 81-90-Jährigen nimmt der Anteil dann wieder ab, da in diesem Alter viele Patienten schon an anderen Erkrankungen verstorben waren. Auch in der vorliegenden Studienpopulation ließ sich damit das kontinuierlich zunehmende KHK-Risiko mit steigendem Lebensalter nachweisen ($p < 0,0001$).

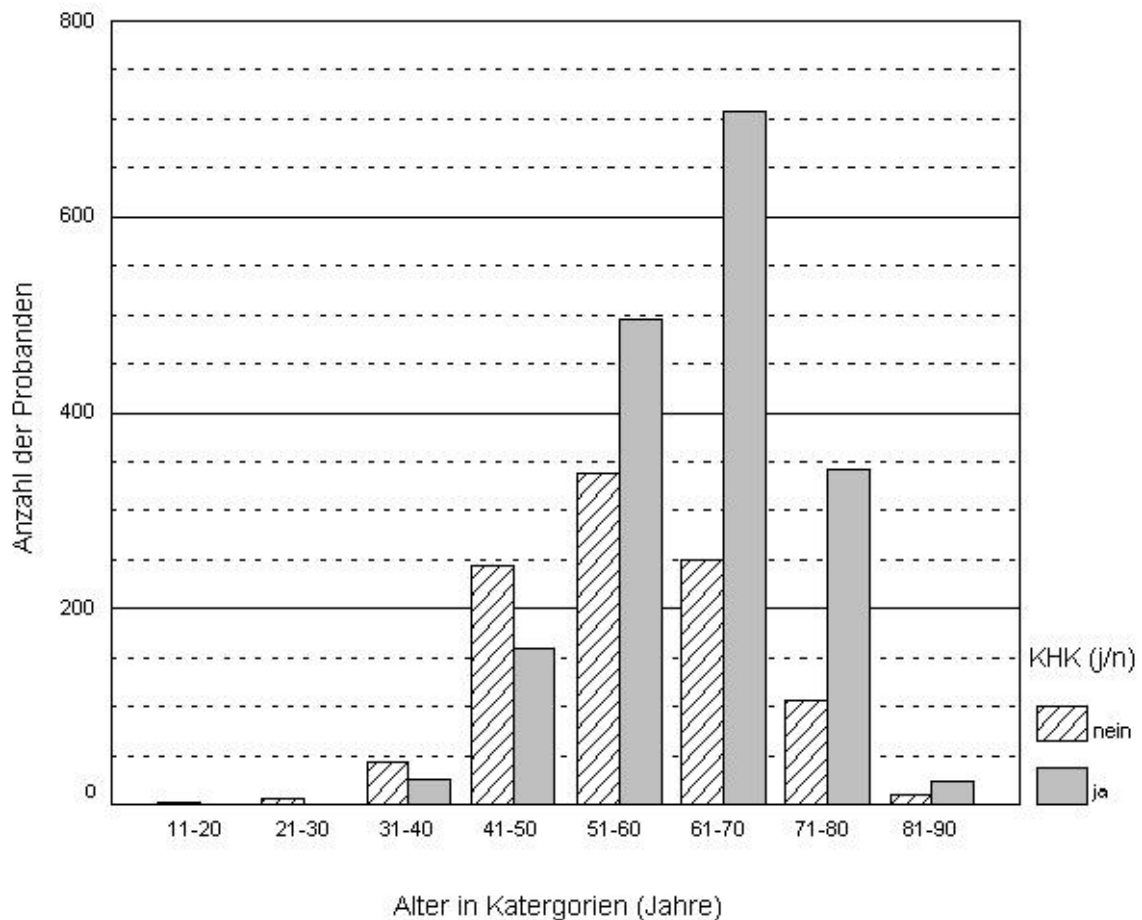


Abb. 12: Risiko der koronaren Herzkrankheit in Abhängigkeit vom Lebensalter

In der vorliegenden Studienpopulation nahm der Anteil der Patienten mit KHK (1-, 2- oder 3-Gefäßerkrankung) mit steigendem Alter zu. Konnte man in der Gruppe der jungen Patienten (31-40 Jahre) 35,8 % (n = 24) mit einer KHK finden, so stieg dieser relative Anteil bei den 51-60-Jährigen deutlich an (59,5 %, n = 491). Der Großteil der Patienten (n = 1538) war in den Alterskategorien zwischen 51 und 80 Jahren zu finden. In der Kategorie von 51-60 Jahren hatten 59,5 % (n = 491) der Patienten eine KHK, zwischen 61-70 Jahren 73,9 % (n = 706) und zwischen 71-80 Jahren 76,3 % (n = 341) der Patienten eine KHK. Abkürzungen: KHK j/n: koronare Herzkrankheit ja/nein

4.3. Verhältnis zwischen Myokardinfarkt und Lebensalter

Wie schon im vorigen Abschnitt bei der Beschreibung des Verhältnisses zwischen KHK und Lebensalter beobachtet wurde, ließ sich auch beim MI der seit langem bekannte Zusammenhang des kontinuierlich zunehmenden MI-Risikos mit steigendem Lebensalter in der vorliegenden Studienpopulation nachweisen ($p < 0,0001$) (Abb. 13).

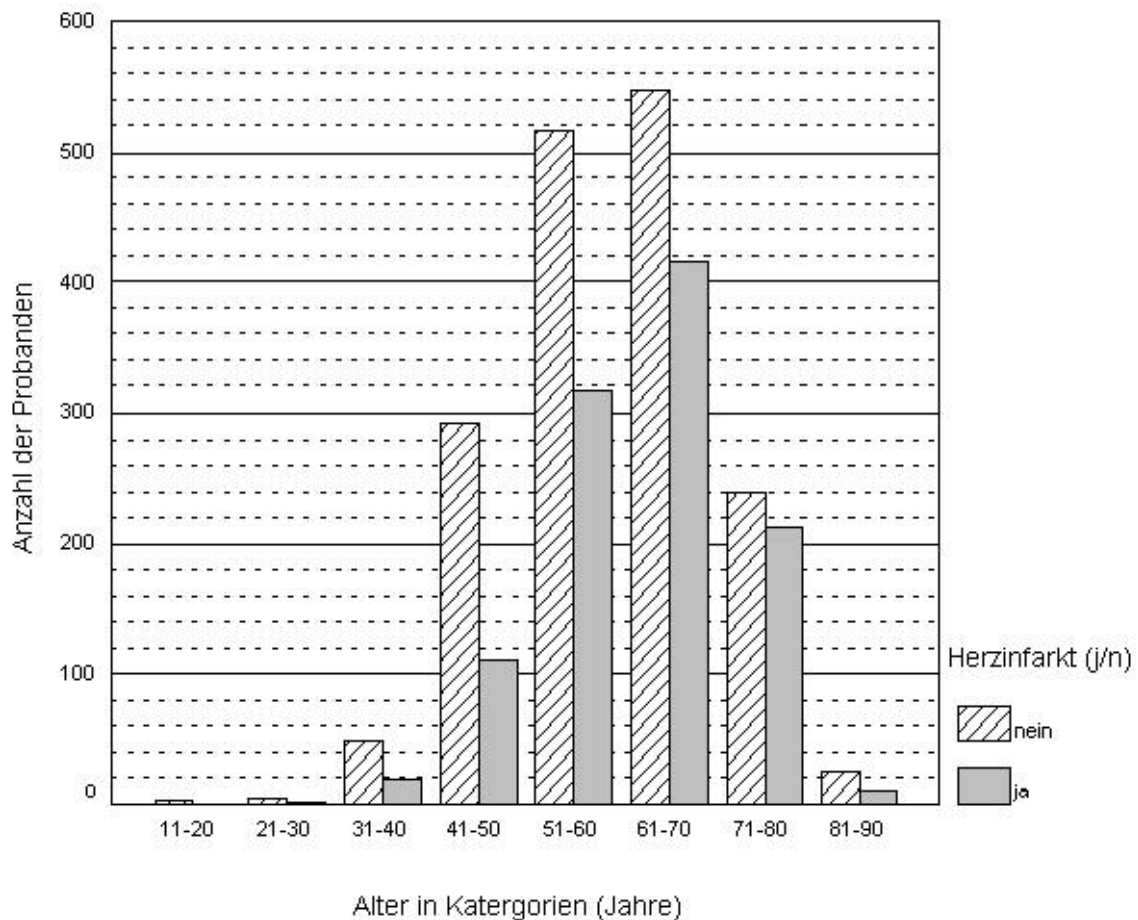


Abb. 13: Myokardinfarktisiko in Abhängigkeit vom Lebensalter

Wie bereits bei der KHK erwähnt, so stieg auch das Myokardinfarktisiko mit dem Lebensalter. Erlitten in der Alterskategorie der 31-40-Jährigen 26,9 % ($n = 18$) der Patienten mindestens einen Myokardinfarkt, so stieg dieser Anteil in der größten Patientengruppe, den 61-70-Jährigen, auf 43,2 % ($n = 411$). Bei den 51-60-Jährigen lag der Patientenanteil mit Myokardinfarkt bei 38,1 % ($n = 316$), und in der Alterskategorie 71-80-Jahre bei 46,8 % ($n = 209$). Abkürzungen: Herzinfarkt j/n: Myokardinfarkt ja/nein

4.4 Zusammenhang zwischen koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt

Der allgemein bekannte Zusammenhang zwischen KHK und MI konnte auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden ($p < 0,0001$) (Abb. 14). So nahm mit zunehmendem Schweregrad der KHK (Anzahl der erkrankten Koronargefäße) auch der Anteil der MI-Patienten zu (siehe Abb. 15). 8,1 % der Patienten mit einer 0-Gefäßerkrankung erlitten einen MI ($n = 81$), 48,9 % mit einer 1-Gefäßerkrankung ($n = 231$), 57,1 % mit einer 2-Gefäßerkrankung ($n = 286$) und 62,1 % der Patienten mit einer 3-Gefäßerkrankung ($n = 478$) erlitten mindestens einen MI (Abb. 15). KHK-Patienten

ohne MI hatten einen durchschnittlichen Gensini-Score von $34,8 \pm 40$. Patienten mit mindestens einem überlebten MI hatten einen durchschnittlichen Gensini-Score von $62,4 \pm 46,2$ (Abb. 16).

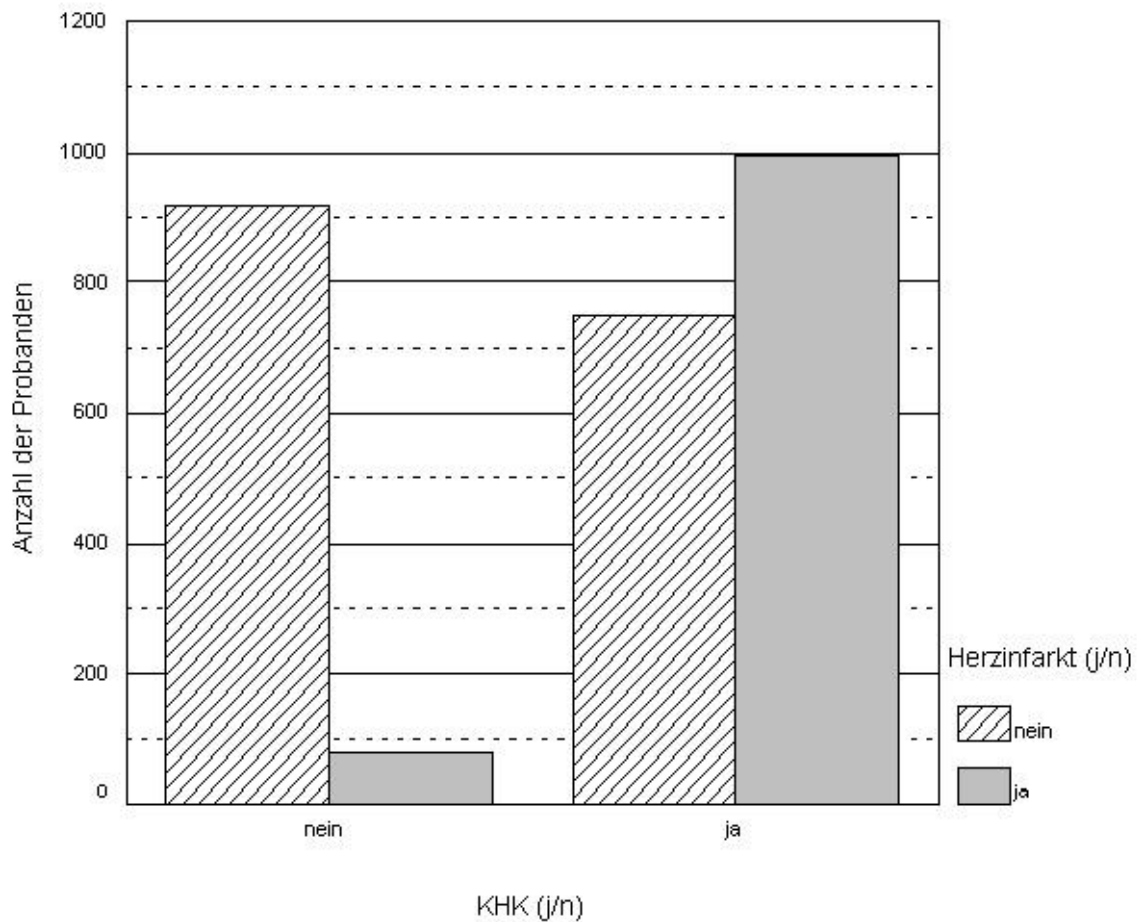


Abb. 14: Zusammenhang zwischen koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt

Patienten ohne KHK (0-Gefäßerkrankung) erlitten nur zu einem geringen Prozentsatz einen MI (8,1 % der Personen), während dieser bei Patienten mit nachgewiesener KHK (hier Patienten mit 1-, 2- und 3-Gefäßerkrankung zusammengefasst) auf ein Mehrfaches anstieg. Die herzgesunden Personen sind in die in der Abbildung dargestellten Analyse mit einbezogen worden. Abkürzungen: KHK j/n: koronare Herzkrankheit ja/nein; Herzinfarkt j/n: Myokardinfarkt ja/nein

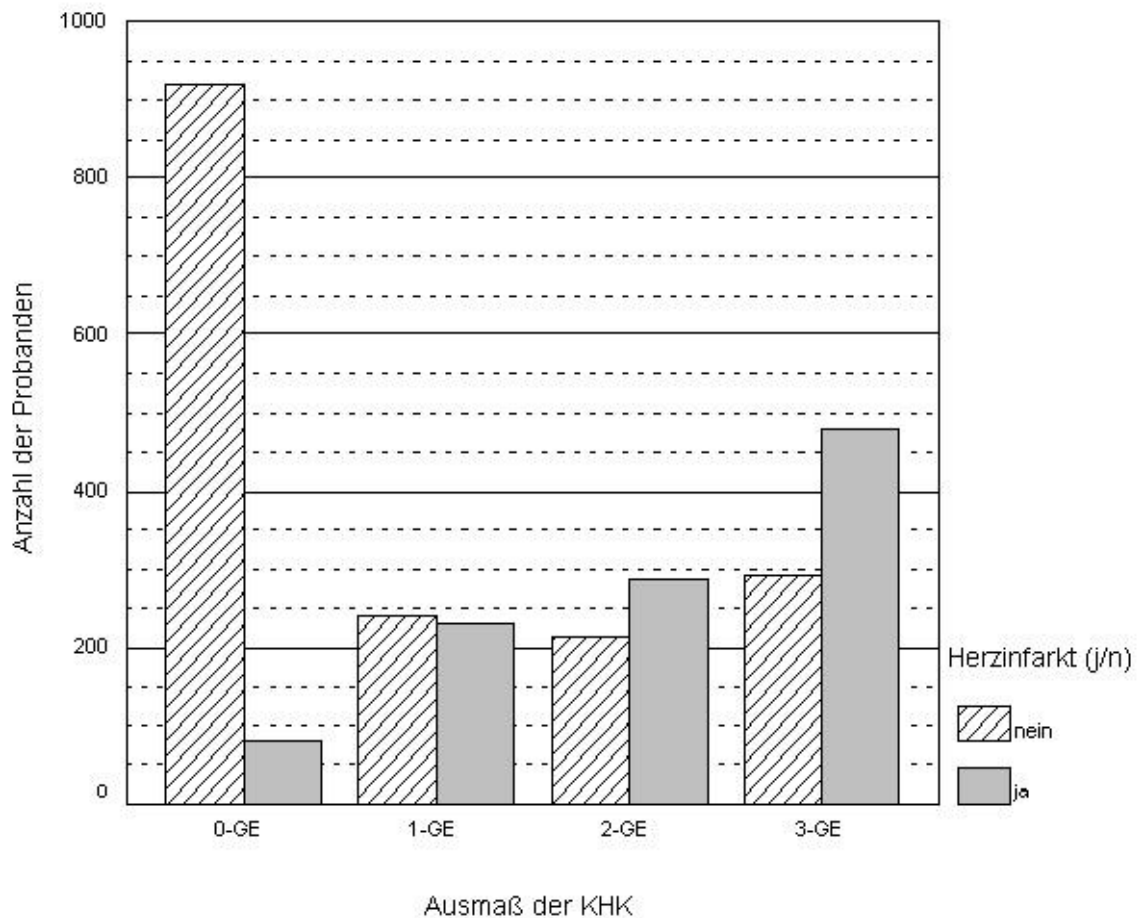


Abb. 15: Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der koronaren Herzkrankheit und dem Myokardinfarkt

Der Anteil der Patienten, die mindestens einen MI erlitten hatten, stieg mit Zunahme des Schweregrades der KHK (0-, 1-, 2-, 3-Gefäßerkrankung). Erlitten bei 0-Gefäßerkrankung nur 8,1 % der Personen einen MI, so stieg dieser Anteil bei der 1-Gefäßerkrankung auf 48,9 %, bei 2-Gefäßerkrankung auf 57,1 % und erreichte bei 3-Gefäßerkrankung 62,1 %. Abkürzungen: KHK: koronare Herzkrankheit; Herzinfarkt (j/n): Myokardinfarkt ja/nein

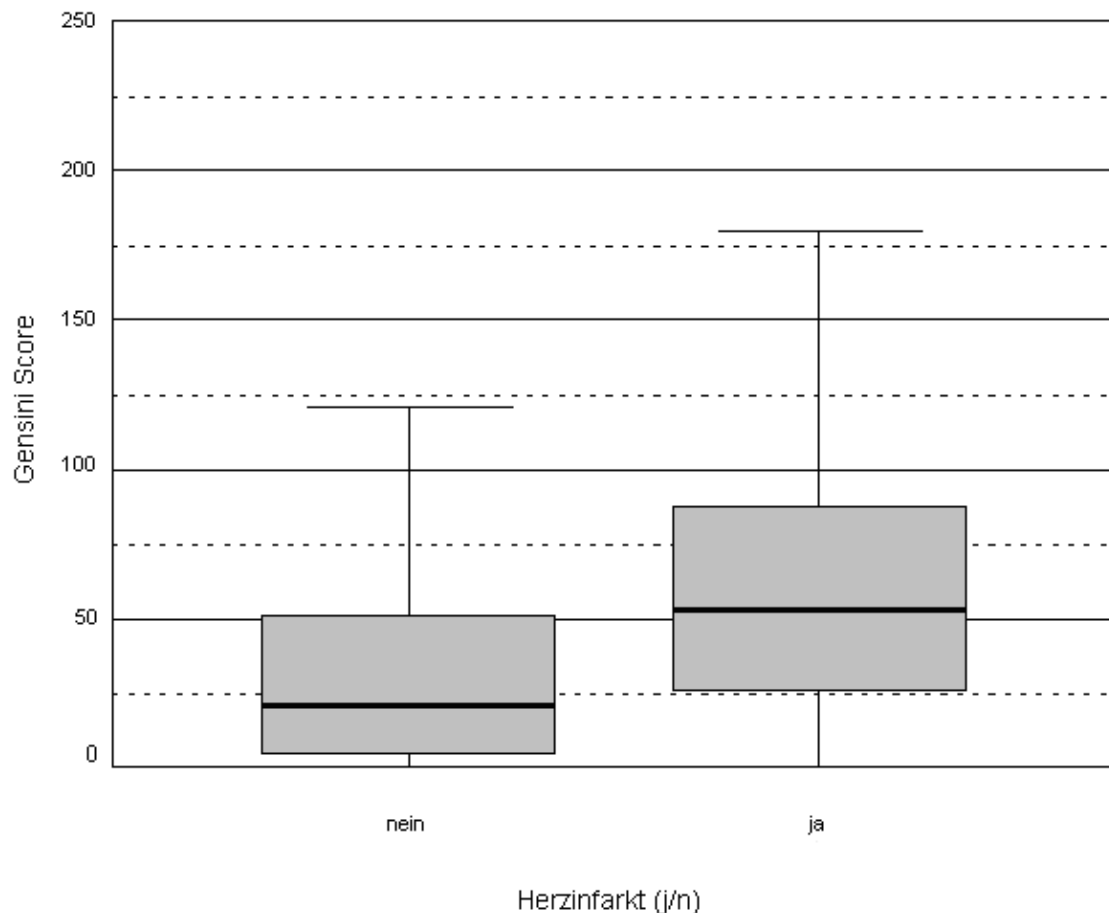


Abb. 16: Abhängigkeit des Gensini-Scores von erlittenem Myokardinfarkt

1076 Patienten hatten mindestens einen MI erlitten. Bei diesem Personenkreis lag der Median des Gensini-Scores bei 53. Bei den Patienten ohne MI lag der Median des Gensini-Scores dagegen nur bei 21. Dargestellt ist die 75ste Perzentile als oberer und die 25ste Perzentile als unterer Kästchenrand. Der jeweilige Median des Gensini-Scores ist als schwarzer Balken dargestellt. Abkürzungen: Herzinfarkt (j/n): Myokardinfarkt ja/nein

4.5. Etablierte Risikofaktoren und protektive Faktoren der koronaren Herzkrankheit

Die etablierten koronaren Risikofaktoren wurden zwischen 469 herzgesunden Kontrollpersonen, 529 koronarangiographierten Patienten ohne KHK und 1743 koronarangiographierten Patienten mit 1-, 2- oder 3-Gefäßerkrankung verglichen. Untersucht wurden die Risikofaktoren Alter, Cholesterin, Triglyzeride, Apolipoprotein B (Apo B), Lipoprotein (a) (Lp (a)), Diabetes mellitus, Hypertonus (HT), Rauchen, Body Mass Index (BMI) und der protektive Faktor Apolipoprotein AI (Apo AI) (Tab. 9). Rauchen wurde als Risikofaktor der KHK und des Schweregrades der KHK

identifiziert, unabhängig davon, ob der Nikotinkonsum in Form der „pack years“ oder durch Unterteilung in Raucher und Nicht-Raucher definiert wurde.

Tab. 9: Nachweis etablierter Risikofaktoren und protektiver Faktoren der koronaren Herzkrankheit

Risikofaktor	-KHK⁽¹⁾ (n = 469)	-KHK⁽²⁾ (n = 529)	+KHK (n = 1743)	2 p⁽¹⁾	2 p⁽²⁾
Alter (Jahre)	55,2 ± 10,3	58,3 ± 11,1	62,7 ± 9,2	< 0,0001	< 0,0001
Chol (mg/dl)	209,7 ± 42,9	206,8 ± 43,4	210,4 ± 42,1	n.s.	n.s.
TG (mg/dl)	137,9 ± 53,2	141,4 ± 93,6	156,4 ± 93,5	n.s.	n.s.
Apo AI (g/l)	1,45 ± 0,24	1,47 ± 0,3	1,43 ± 0,28	< 0,0001	< 0,0001
Apo B (g/l)	1,11 ± 0,26	1,20 ± 0,32	1,29 ± 0,34	< 0,0001	< 0,0001
Apo AI/ApoB	1,38 ± 0,43	1,29 ± 0,45	1,17 ± 0,44	< 0,0001	0,005
Lp(a) (mg/dl)	19,9 ± 26,0	21,2 ± 29,6	29,8 ± 38,6	0,019	< 0,0001
Diabetes (%)	7	12	21	0,004	< 0,0001
HT (%)	15	55	65	< 0,0001	0,002
BMI (kg/m ²)	26,3 ± 3,3	27,1 ± 3,8	26,9 ± 3,3	n.s.	n.s.
pack years	16,0 ± 28,1	20,8 ± 24,6	23,8 ± 26,6	0,004	0,042

Alter, BMI, Rauchen (pack years), Cholesterin, Triglyzeride, Apo AI, Apo B, Apo AI/Apo B ratio und Lp (a) wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Hypertonus und Diabetes mellitus wurden als relative Häufigkeiten (Prozente) der Patienten in den drei Gruppen aufgeführt. Koronargefäße mit einer Stenose > 50 % wurden als „erkrankt“ definiert. Die etablierten Risikofaktoren der KHK wurden mit der multiplen logistischen Regression bestimmt. Ein zweiseitiger p-Wert < 0,05 wurde als signifikanter Unterschied definiert. Abkürzungen und Erklärungen: Apo AI: Apolipoprotein AI; Apo B: Apolipoprotein B; BMI: Body Mass Index; Chol: Cholesterin; HT: Hypertonus; -KHK⁽¹⁾: herzgesunde Kontrollpersonen; -KHK⁽²⁾: koronarangiographierte Patienten ohne KHK (0-Gefäßerkrankung bzw. Stenose < 50 %); +KHK: koronarangiographierte Patienten mit 1-, 2- oder 3-Gefäßerkrankung; Lp (a): Lipoprotein (a); n: Anzahl; ns: nicht signifikant; p: Signifikanz; p⁽¹⁾: KHK-Patienten versus herzgesunde Kontrollpersonen; p⁽²⁾: KHK-Patienten versus Probanden ohne KHK (herzgesunde Kontrollpersonen und koronarangiographierte Patienten mit Stenose < 50 %); TG: Triglyzeride

4.6. Etablierte Risikofaktoren und protektive Faktoren des Myokardinfarktes

Die etablierten koronaren Risikofaktoren wurden zwischen 469 herzgesunden Kontrollpersonen, 1196 koronarangiographierten Patienten ohne MI und 1076 koronarangiographierten Patienten, die mindestens einen MI erlitten hatten, verglichen. Hier konnten beim Vergleich zwischen den herzgesunden Kontrollpersonen und den koronarangiographierten Patienten mit mindestens einem MI Alter, Apo B, der Quotient Apo AI/ Apo B, Lp (a), Diabetes mellitus, Hypertonus und Rauchen (pack years) als koronare Risikofaktoren und Apo AI als protektiver Faktor nachgewiesen werden. Beim

Vergleich der koronarangiographierten Patienten ohne MI mit den koronarangiographierten Patienten mit mindestens einem MI waren dies als Risikofaktoren Alter, Apo B, der Quotient Apo AI/ Apo B und Rauchen (pack years) und als protektiver Faktor das Apo AI (Tab. 10).

Tab. 10: Nachweis etablierter Risikofaktoren und protektiver Faktoren des Myokardinfarktes

Risikofaktor	-MI⁽¹⁾ (n = 469)	-MI⁽²⁾ (n = 1196)	+MI (n = 1076)	p⁽¹⁾	p⁽²⁾
Alter (Jahre)	55,2 ± 10,3	61,3 ± 10,2	62,1 ± 9,5	< 0,0001	0,004
Chol (mg/dl)	209,7 ± 42,9	210,2 ± 42,2	208,7 ± 42,6	n.s.	n.s.
TG (mg/dl)	137,9 ± 53,2	150,9 ± 98	155 ± 88,5	n.s.	n.s.
Apo AI (g/l)	1,45 ± 0,24	1,45 ± 0,29	1,42 ± 0,29	< 0,0001	0,002
Apo B (g/l)	1,11 ± 0,26	1,26 ± 0,33	1,29 ± 0,34	< 0,0001	0,019
Apo AI/ApoB	1,39 ± 0,43	1,22 ± 0,4	1,18 ± 0,49	< 0,0001	0,017
Lp (a) (mg/dl)	19,9 ± 26,0	26,6 ± 36,9	29,2 ± 37,3	0,016	n.s.
Diabetes (%)	7	17	21	0,019	n.s.
HT (%)	15	63	62	< 0,0001	n.s.
BMI (kg/m ²)	26,3 ± 3,3	27,0 ± 3,5	26,9 ± 3,4	n.s.	n.s.
pack years	16,0 ± 28,1	20,8 ± 24,6	25,8 ± 27,3	< 0,0001	< 0,0001

Alter, BMI, Rauchen (pack years), Cholesterin, Triglyzeride, Apo AI, Apo B, Apo AI/Apo B und Lp (a) wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Hypertonus und Diabetes mellitus wurden als relative Häufigkeiten (Prozente) der Patienten in den drei Gruppen aufgeführt. Der MI wurde nach den WHO-Kriterien diagnostiziert (Braunwald, Circulation 1989). Die etablierten Risikofaktoren des MI wurden mit der mutiplen logistischen Regression bestimmt. Ein zweiseitiger p-Wert < 0,05 wurde als signifikanter Unterschied definiert. Abkürzungen: Apo AI: Apolipoprotein AI; Apo B: Apolipoprotein B; BMI: Body Mass Index; Chol: Cholesterin; HT: Hypertonus; Lp (a): Lipoprotein (a); MI: Myokardinfarkt; -MI⁽¹⁾: herzgesunde Kontrollpersonen; -MI⁽²⁾: koronarangiographierte Patienten ohne Myokardinfarkt; +MI: koronarangiographierte Patienten, die mindestens einen Myokardinfarkt erlitten hatten; n: Anzahl; ns: nicht signifikant; p: Signifikanz; p⁽¹⁾: herzgesunde Kontrollpersonen versus Patienten mit MI, p⁽²⁾: Patienten mit MI versus Patienten ohne MI (herzgesunde Kontrollpersonen und koronarangiographierte Patienten ohne MI); TG: Triglyzeride

4.7. Verteilung der Genotypen des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ in der Studienpopulation

Bei dem untersuchten Längenpolymorphismus VNTR handelt es sich nicht um einen Mendelschen Erbgang. Bei den vier verschiedenen Allelen gibt es insgesamt zehn verschiedene mögliche Kombinationen. Einige Genotypen sind sehr häufig, andere extrem selten. Während z.B. Genotyp AA gar nicht und die Genotypen AB und AD in der vorliegenden Gesamtpopulation von Mitteleuropäern nur zu jeweils 0,04 % (n = jeweils 1) vorkommen, ist der Genotyp CC mit 70,9 % (n = 1942) am häufigsten vertreten (Tab. 11).

Es wurden die Genotypverteilungen bei den herzgesunden Kontrollpersonen mit denen der koronarangiographierten Patienten ohne und mit KHK (Tab. 12) sowie koronarangiographierte Patienten ohne und mit MI verglichen (Tab. 13). Im Rahmen dieses Vergleiches zwischen herzgesunden Kontrollpersonen und KHK-Patienten wurde bei einem Signifikanzniveau von $p = 0,094$ keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Eine gleichartige Schlussfolgerung muss aus dem Vergleich zwischen herzgesunden Probanden und Patienten mit mindestens einem MI ($p = 0,053$) gezogen werden.

Tab. 11: Verteilung der verschiedenen Genotypen in der Studienpopulation

Genotyp	Anzahl (n = 2741)	Anzahl (%)
AA	0	0 %
AB	1	0,04 %
AC	6	0,2 %
AD	1	0,04 %
BB	16	0,6 %
BC	389	14,2 %
BD	36	1,3 %
CC	1942	70,9 %
CD	337	12,3 %
DD	13	0,5 %

Der Längenpolymorphismus VNTR wurde durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und anschließende Gel-Elektrophorese aus EDTA-Blut analysiert. 100 % wurde aufgrund der Ab- und Aufrundungen nicht exakt erreicht. Abkürzungen: n: Anzahl der Probanden

Tab. 12: Verteilung der Genotypen in der Kontrollgruppe sowie in den Gruppen der koronarangiographierten Patienten ohne und mit koronarer Herzkrankheit

Genotyp	-KHK⁽¹⁾		-KHK⁽²⁾		+KHK	
	(n = 469) (%)		(n = 529) (%)		(n = 1743) (%)	
AA	0	0 %	0	0 %	0	0 %
AB	1	0,2 %	0	0 %	0	0 %
AC	0	0 %	1	0,2 %	5	0,3 %
AD	0	0 %	0	0 %	1	0,1 %
BB	5	1,1 %	0	0 %	11	0,6 %
BC	54	11,5 %	81	15,3 %	254	14,6 %
BD	8	1,7 %	3	0,6 %	25	1,4 %
CC	349	74,4 %	376	71,1 %	1217	69,9 %
CD	48	10,2 %	66	12,5 %	223	12,8 %
DD	4	0,9 %	2	0,4 %	7	0,4 %

Der Längenpolymorphismus VNTR wurde durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und anschließende Gel-Elektrophorese aus EDTA-Blut analysiert. 100 % wurde aufgrund der Ab- und Aufrundungen nicht immer exakt erreicht. Die statistische Beziehung des Längenpolymorphismus VNTR zum Risiko der KHK wurde mit Hilfe der multiplen logistischen Regression unter Berücksichtigung der etablierten Risikofaktoren bestimmt. Abkürzungen: KHK: koronare Herzkrankheit; -KHK⁽¹⁾: herzgesunde Kontrollpersonen; -KHK⁽²⁾: koronarangiographierte Patienten ohne KHK (0-Gefäßerkrankung bzw. Stenose < 50 %); +KHK: koronarangiographierte Patienten mit 1-, 2- oder 3-Gefäßerkrankung; n: Anzahl

Tab. 13: Verteilung der verschiedenen Genotypen in der Kontrollgruppe sowie in den Gruppen der koronarangiographierten Patienten ohne und mit Myokardinfarkt

Genotyp	-MI⁽¹⁾ (n = 469) (%)		-MI⁽²⁾ (n = 1196) (%)		+MI (n = 1076) (%)	
AA	0	0 %	0	0 %	0	0 %
AB	1	0,2 %	0	0 %	0	0 %
AC	0	0 %	5	0,4 %	1	0,1 %
AD	0	0 %	1	0,1 %	0	0 %
BB	5	1,1 %	5	0,4 %	6	0,6 %
BC	54	11,5 %	180	15,1 %	155	14,4 %
BD	8	1,7 %	14	1,2 %	14	1,3 %
CC	349	74,4 %	849	71 %	744	69,9 %
CD	48	10,2 %	136	11,4 %	153	14,2 %
DD	4	0,9 %	6	0,5 %	3	0,3 %

Der Längenpolymorphismus VNTR wurde durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und anschließende Gel-Elektrophorese aus EDTA-Blut analysiert. 100 % wurde aufgrund der Ab- und Aufrundungen nicht immer exakt erreicht. Die statistische Beziehung des Längenpolymorphismus VNTR zum Risiko des MI wurde mit Hilfe der multiplen logistischen Regression unter Berücksichtigung der etablierten Risikofaktoren bestimmt. Abkürzungen: MI: Myokardinfarkt; -MI⁽¹⁾: herzgesunde Kontrollpersonen; -MI⁽²⁾: koronarangiographierte Patienten ohne Myokardinfarkt; +MI: koronarangiographierte Patienten, die mindestens einen Myokardinfarkt erlitten hatten; n: Anzahl

4.8 Vergleich der klinischen und klinisch-chemischen koronaren Risikofaktoren bei den vier häufigsten Genotypen des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ BC, BD, CC und CD

Die vier häufigsten Genotypen BC (n = 389/2741, (14,2 %)); BD (n = 36/2741, (1,3 %)); CC (n = 1942/2741, (70,9 %)) und CD (n = 337/2741, (12,3 %)) wurden hinsichtlich der klinischen koronaren Risikofaktoren Alter, Diabetes mellitus, Hypertonus, BMI und Rauchgewohnheiten sowie der klinisch-chemischen Variablen Cholesterin, Triglyceride, Apo B, Apo AI/Apo B Ratio, Lp(a) und dem protektiven Faktor Apo AI miteinander verglichen. Es zeigten sich mit Ausnahme des Diabetes mellitus keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Genotypen in Bezug auf die etablierten koronaren Risikofaktoren: Einzig die Prävalenz von Diabetes mellitus ist deutlich kleiner bei den BD-Heterozygoten (3 %) als bei den anderen VNTR-Genotypen (15-18 %). (Tab. 14).

Tab. 14: Vergleich der klinischen und klinisch-chemischen koronaren Risikofaktoren/protektiven Faktoren bei den vier häufigsten Genotypen BC, BD, CC und CD des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“

Variablen	BC (n = 389)	BD (n = 36)	CC (n = 1942)	CD (n = 337)	p
Alter (Jahre)	60,1 ± 10,2	59,2 ± 8,9	60,6 ± 10,3	60,9 ± 10,2	0,563
Chol (mg/dl)	210 ± 43	196 ± 40	209 ± 43	212 ± 43	0,165
TG (mg/dl)	154 ± 103	133 ± 48	152 ± 88	142 ± 76	0,095
Apo AI (g/l)	1,44 ± 0,28	1,45 ± 0,31	1,44 ± 0,28	1,43 ± 0,28	0,987
Apo B (g/l)	1,25 ± 0,33	1,14 ± 0,28	1,24 ± 0,33	1,24 ± 0,32	0,303
ApoAI/ApoB	1,22 ± 0,38	1,32 ± 0,34	1,23 ± 0,47	1,23 ± 0,44	0,662
Lp(a) (mg/l)	29,0 ± 38,1	21,4 ± 29,5	25,8 ± 34,5	27,7 ± 37,4	0,305
Diabetes (%)	15	3	18	15	0,049
HT (%)	56	53	54	56	0,889
BMI (kg/m ²)	27,1 ± 3,7	27,1 ± 2,8	26,8 ± 3,4	26,8 ± 3,4	0,481
pack years	22,9 ± 27,9	23,6 ± 22,5	21,8 ± 26,8	19,3 ± 24,5	0,381

Die insgesamt 2704 Probanden der vier häufigsten Genotypen wurden hinsichtlich der etablierten klinischen koronaren Risikofaktoren verglichen. Auf Genotyp-abhängige Unterschiede wurde mittels Kruskal-Wallis-1-Way Anova (kontinuierliche Variablen) bzw. mittels χ^2 -Test (binäre Variablen) überprüft. Ein Ergebnis ist signifikant bei $p < 0,05$. Alter, BMI, Rauchen (pack years), Cholesterin, Triglyzeride, Apo AI, Apo B, Apo AI/Apo B und Lp (a) wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Hypertonus und Diabetes mellitus wurden als relative Häufigkeiten (Prozente) der Patienten in den vier Gruppen aufgeführt. Die VNTR-Genotypen wurden durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Gel-Elektrophorese aus EDTA-Blut bestimmt. Abkürzungen: Apo AI: Apolipoprotein AI; Apo B: Apolipoprotein B; BMI: Body Mass Index; Chol: Cholesterin; HT: Hypertonus; Lp (a): Lipoprotein (a); n: Anzahl; p: Signifikanz; TG: Triglyzeride

4.9. Beziehung zwischen dem Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha und der koronaren Herzkrankheit

4.9.1. RISIKO DER KORONAREN HERZKRANKHEIT

Wurden die herzgesunden Kontrollpersonen (n = 469) ohne KHK mit den koronarangiographierten Patienten mit KHK verglichen, so konnte weder in der gesamten Studienpopulation (n = 2272, $p = 0,329$), noch in den Hoch- und Niedrigrisikogruppen (Definitionen siehe 3.5.) eine Assoziation zwischen dem

Längenpolymorphismus VNTR des GPIIb α und dem Risiko für eine KHK gefunden werden.

Das gleiche galt, wenn nur die vier häufigsten VNTR-Genotypen (BC, BD, CC, CD; n = 2178; p = 0,749) berücksichtigt wurden.

Ebenso ergaben die Vergleiche zwischen (a) CC-Homozygoten und den anderen Genotypen (p = 0,157) (Ergebnisse nicht dargestellt), (b) CC-Homozygoten und entweder BC- und BB-Genotypen (p = 0,258) oder CD- und DD-Genotypen (p = 0,136) (Tab. 15), (c) C-Allel-Trägern und anderen Allelträgern (p = 0,509) (Ergebnisse nicht dargestellt), (d) CD-Heterozygoten und anderen Genotypen (p = 0,231) (Tab. 16) und (e) BC-Heterozygoten und anderen Genotypen (p = 0,489) (Tab. 16) keine Assoziationen zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem Risiko für eine KHK sowohl in der gesamten Studienpopulation als auch in Hoch- und Niedrigrisikogruppen (Ergebnisse nicht dargestellt).

Dagegen näherten sich die Analysen der Signifikanz, wenn die Verteilung von heterozygoten und homozygoten VNTR-Genotypen zwischen herzgesunden Kontrollpersonen und KHK-Patienten verglichen wurden (p = 0,068; Odds Ratio = 1,32; KI = 0,98-1,75) (Tab. 17).

Tab. 15: Genotypen des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha und das Risiko für eine koronare Herzkrankheit

Genotyp	Kontrollgruppe	Patienten	OR (95 % KI)	p
BC + BB	59	265	1,25 (0,85-1,82)	0,258
CC	349	1217	-	-
CD + DD	52	230	1,37 (0,91-2,08)	0,136

Das Vorkommen der VNTR-Genotypen BC + BB sowie CD + DD wurde mit denen der CC-Homozygoten zwischen den gesunden Kontrollpersonen und den koronarangiographierten Patienten mit KHK verglichen. Signifikanz p < 0,05. Unter Berücksichtigung der etablierten Risikofaktoren der KHK wurden die Odds Ratios als relative Risiken der KHK berechnet, welche mit den BC + CC- bzw. CD + DD-Genotypen im Vergleich zu den CC-Homozygoten verbunden sind. Für jede Odds Ratio wurde ein zweiseitiger p-Wert und ein 95 %-iges Konfidenzintervall unter Berücksichtigung der koronaren Risikofaktoren bestimmt.

Abkürzungen: KI: Konfidenzintervall; OR: odds ratio; p: Signifikanz

Tab. 16: Risiko für eine koronare Herzkrankheit bei CD- und BC-Heterozygoten gegenüber anderen Genotypen des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“

Genotyp	Kontrollgruppe	Patienten	OR (95 % KI)	p
CD	48	223	1,28 (0,85-1,93)	0,231
Andere	421	1520	-	-

Genotyp	Kontrollgruppe	Patienten	OR (95 % KI)	p
BC	54	254	1,20 (0,82-1,75)	0,489
Andere	415	1489	-	-

Das Vorkommen der VNTR-Genotypen CD und BC gegenüber den anderen VNTR-Genotypen wurde zwischen den gesunden Kontrollpersonen und den koronarangiographierten Patienten mit KHK verglichen. Signifikanz $p < 0,05$. Unter Berücksichtigung der etablierten Risikofaktoren der KHK wurden die Odds Ratios als relative Risiken der KHK berechnet, welche mit den BC- bzw. CD-Genotypen im Vergleich zu den anderen Genotypen verbunden sind. Für jede Odds Ratio wurde ein zweiseitiger p-Wert und ein 95 %-iges Konfidenzintervall unter Berücksichtigung der koronaren Risikofaktoren bestimmt. Abkürzungen: KI: Konfidenzintervall; OR: odds ratio; p: Signifikanz

Tab. 17: Risiko für die koronare Herzkrankheit bei heterozygoten und homozygoten Genotypen des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“

Heterozygote		Homozygote		OR (95% KI)	p
Kontrollgruppe	+KHK	Kontrollgruppe	+KHK		
111	508	358	1235	1,32 (0,98-1,75)	0,068

Das Vorkommen der hetero- und homozygoten VNTR-Genotypen wurde zwischen den herzgesunden Kontrollpersonen und koronarangiographierten Patienten mit KHK verglichen. Unter Berücksichtigung der etablierten Risikofaktoren der KHK wurde die Odds Ratios als relatives Risiko der KHK berechnet, welches mit den heterozygoten im Vergleich zu den homozygoten Genotypen verbunden ist. Signifikanz $p < 0,05$. Für die Odds Ratio wurde ein zweiseitiger p-Wert und ein 95 %-iges Konfidenzintervall unter Berücksichtigung der koronaren Risikofaktoren bestimmt. Abkürzungen: +KHK: koronarangiographierte Patienten mit koronarer Herzkrankheit; OR: Odds Ratio; p: Signifikanz

4.9.2. *AUSMAß DER KORONAREN HERZKRANKHEIT*

Weder in der gesamten Studienpopulation noch in den Hoch- und Niedrigrisikogruppen (Ergebnisse nicht dargestellt) konnte ein statistischer Zusammenhang zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR des GPIIb α und dem Ausmaß der KHK ermittelt werden. Diese Ergebnisse trafen sowohl bei der Definition des Ausmaßes der koronaren Herzkrankheit über die Anzahl der betroffenen Gefäße (1-, 2- oder 3-Gefäßerkrankung) als auch bei der Definition über den Gensini-Score (siehe 3.2.) zu (Ergebnisse nicht dargestellt).

4.10. *Beziehung zwischen dem Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha und der koronaren Herzkrankheit in Niedrigrisikogruppen mit günstigem Lipidprofil*

Wie bereits in 4.9.1. dargestellt, wurde keine Signifikanz ($p = 0,068$) bezüglich des Risikos für eine KHK beim Vergleich zwischen den heterozygoten und homozygoten Genotypen festgestellt. Damit stellt ein heterozygoter Genotyp in der Gesamtpopulation keinen eigenständigen, von den klassischen Risikofaktoren unabhängigen Risikofaktor für eine KHK dar.

In den meisten Niedrig- und Hochrisikogruppen konnten keine Assoziationen zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem KHK-Risiko nachgewiesen werden. Diese Aussage trifft auch für den Vergleich zwischen hetero- und homozygoten Genotypen zu (Ergebnisse nicht dargestellt).

Allerdings fanden sich Assoziationen zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem KHK-Risiko in Niedrigrisikogruppen mit günstigem kardiovaskulärem Lipidprofil, wenn heterozygote mit homozygoten VNTR-Genotypen verglichen wurden (Tab. 18). Diese Assoziationen fanden sich bei Patienten mit hohem Apo AI $\geq 1,44$ g/l ($p = 0,044$) und bei Patienten mit niedrigem Apo B $\leq 1,24$ g/l ($p = 0,021$) (Tab. 18). Eine Assoziation zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem KHK-Risiko zeigte sich auch in der Niedrigrisikogruppe, die durch Kombination aus hohem Apo AI $\geq 1,44$ g/l und niedrigem Apo B $\leq 1,24$ g/l ($p = 0,006$) gekennzeichnet war (Tab. 18).

Bei diesen Analysen zeigte sich, dass die Heterozygoten in der Gruppe der KHK-Patienten überrepräsentiert und die Homozygoten unterrepräsentiert waren. Die

Heterozygoten hatten somit in diesen Gruppen ein höheres KHK-Risiko, das offensichtlich unabhängig von der absoluten Länge der VNTR-Variablen auf der Thrombozytenoberfläche war.

Tab. 18: Heterozygote Genpolymorphismen als Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit in Niedrigrisikogruppen mit günstigem Lipidprofil

Niedrigrisiko- gruppe	Heterozygote		Homozygote		p
	Kontrollgruppe	+KHK Patienten	Kontrollgruppe	+KHK Patienten	
Apo AI $\geq 1,44$ g/l	54	233	180	514	0,044
Apo B $\leq 1,24$ g/l	82	261	224	537	0,021
Apo AI $\geq 1,44$ g/l + Apo B $\leq 1,24$ g/l	37	90	128	197	0,006

Die statistische Beziehung des Längenpolymorphismus VNTR zum Risiko der KHK wurde mit Hilfe der multiplen logistischen Regression unter Berücksichtigung der etablierten Risikofaktoren bestimmt. Signifikanz $p < 0,05$. Abkürzungen: Apo AI: Apolipoprotein AI; Apo B: Apolipoprotein B; +KHK: koronarangiographierte Patienten mit 1-, 2- oder 3- Gefäßerkrankung; p: Signifikanz

4.11. Beziehung zwischen dem Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha und dem Myokardinfarkt

Wurden die gesunden Kontrollpersonen mit den Patienten verglichen, die mindestens einen MI erlitten hatten, so konnte weder in der gesamten Studienpopulation ($n = 1545$; $p = 0,704$) noch in den Hoch- und Niedrigrisikogruppen (siehe 3.5.) eine Assoziation zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR des GPIb α und dem Risiko für einen MI gefunden werden. Ähnliche Ergebnisse wurden beobachtet, wenn nur die vier häufigsten VNTR-Genotypen (BC, BD, CC, CD; $n = 1525$; $p = 0,975$) analysiert wurden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Ebenso ergaben die Vergleiche zwischen (a) CC-Homozygoten und den anderen Genotypen ($p = 0,140$) (Ergebnisse nicht dargestellt), (b) CC-Homozygoten und entweder BC- und BB-Genotypen ($p = 0,649$) (Tab. 19) oder CD- und DD-Genotypen ($p = 0,134$) (Tab. 19), (c) C-Allel-Trägern und anderen Genotypen ($p = 0,105$)

(Ergebnisse nicht dargestellt), (d) CD-Heterozygoten und anderen Genotypen ($p = 0,131$) (Tab. 20) und (e) BC-Heterozygoten und anderen Genotypen ($p = 0,597$) (Tab. 20) keine Assoziationen zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem Risiko für einen MI in der gesamten Studienpopulation. Gleichartige Beobachtungen wurden in den Hoch- und Niedrigrisikogruppen gemacht (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Analysen näherten sich der Signifikanz, wenn die Verteilung von heterozygoten und homozygoten VNTR-Genotypen zwischen herzgesunden Kontrollpersonen und Patienten mit MI verglichen wurden ($p = 0,068$) (Tab. 21).

Tab. 19: Genotypen des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha und das Risiko für einen Myokardinfarkt

Genotyp	Kontrollgruppe	MI-Patienten	OR (95 % KI)	p
BC + BB	59	161	1,10 (0,61-1,35)	0,649
CC	349	744	-	-
CD + DD	52	156	1,39 (0,91-2,13)	0,134

Das Vorkommen der VNTR-Genotypen BC + BB sowie CD + DD wurde mit denen der CC-Homozygoten zwischen den gesunden Kontrollpersonen und den Patienten verglichen, die mindestens einen MI erlitten hatten. Signifikanz $p < 0,05$. Unter Berücksichtigung der etablierten Risikofaktoren des MI wurden die Odds Ratios als relative Risiken des MI berechnet, welche mit den BC + BB- bzw. CD + DD-Genotypen im Vergleich zu den CC-Homozygoten verbunden sind.

Abkürzungen: KI: Konfidenzintervall; p: Signifikanz; OR: Odds Ratio

Tab. 20: Risiko für einen Myokardinfarkt bei CD- und BC-Heterozygoten gegenüber den anderen Genotypen des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“

Genotyp	Kontrollgruppe	MI-Patienten	OR (95 % KI)	p
CD	48	153	1,39 (0,91-2,13)	0,131
Andere	421	923	-	-

Genotyp	Kontrollgruppe	MI-Patienten	OR (95 % KI)	p
BC	54	155	1,19 (0,74 - 1,69)	0,597
Andere	415	921	-	-

Das Vorkommen der VNTR-Genotypen CD und BC gegenüber den anderen Genotypen wurde zwischen den gesunden Kontrollpersonen und den koronarangiographierten Patienten mit mindestens einem Myokardinfarkt verglichen. Signifikanz $p < 0,05$. Unter Berücksichtigung der etablierten Risikofaktoren des MI wurden die Odds Ratios als relative Risiken des MI berechnet, welche mit den CD- und BC-Genotypen im Vergleich zu den übrigen VNTR-Genotypen verbunden sind.

Abkürzungen: KI: Konfidenzintervall; p: Signifikanz; OR: Odds Ratio

Tab. 21: Risiko für einen Myokardinfarkt bei heterozygoten und homozygoten Genotypen des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“

Heterozygote		Homozygote		OR (95% KI)	p
Kontrollgruppe	+MI Patienten	Kontrollgruppe	+MI Patienten		
111	323	358	753	1,33 (0,98 - 1,82)	0,068

Das Vorkommen der hetero- und homozygoten VNTR-Genotypen wurde zwischen den herzgesunden Kontrollpersonen und koronarangiographierten Patienten mit MI verglichen. Die statistische Beziehung des Längenpolymorphismus VNTR zum Risiko des MI wurde mit Hilfe der multiplen logistischen Regression unter Berücksichtigung der etablierten Risikofaktoren bestimmt. Signifikanz $p < 0,05$. Für die Odds Ratio wurde ein zweiseitiger p-Wert und ein 95 %-iges Konfidenzintervall unter Berücksichtigung der koronaren Risikofaktoren bestimmt. Abkürzungen: +MI: koronarangiographierte Patienten mit Myokardinfarkt; OR: odds ratio; p: Signifikanz

4.12. Beziehung zwischen dem Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha und dem Risiko für einen Myokardinfarkt in Niedrigrisikogruppen mit günstigem Lipidprofil

Wie schon in 4.11. dargelegt, zeigte sich in der Gesamtpopulation keine Signifikanz ($p = 0,068$) bezüglich des Risikos für einen MI beim Vergleich zwischen den heterozygoten und homozygoten VNTR-Genotypen. Damit stellt auch beim MI ein heterozygoter VNTR-Genotyp keinen eigenständigen, von den klassischen Risikofaktoren unabhängigen Risikofaktor für einen MI in der Gesamtpopulation dar.

Die Studienpopulation wurde anhand des Mittelwertes bzw. durch das Fehlen/Vorhandensein von etablierten Risikofaktoren für einen MI in verschiedene Niedrig- bzw. Hochrisikogruppen eingeteilt (siehe 3.5). In Hochrisikogruppen konnten keine Assoziationen zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem MI-Risiko nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Diese Aussage trifft auch für den Vergleich zwischen hetero- und homozygoten Genotypen zu (Ergebnisse nicht dargestellt).

Dagegen fanden sich Assoziationen zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem MI-Risiko in Niedrigrisikogruppen mit günstigem kardiovaskulärem Lipidprofil,

wenn heterozygote mit homozygoten VNTR-Genotypen verglichen wurden (Tab. 22). Diese Assoziationen fanden sich bei Patienten mit niedrigem ApoB $\leq 1,24$ g/l ($p = 0,029$) (Tab. 22). Die Assoziation näherte sich der Signifikanz bei Patienten mit einem hohem Apo AI $\geq 1,44$ g/l ($p = 0,058$) (Tab. 22). Eine Assoziation zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem MI-Risiko zeigte sich auch in der Niedrigrisikogruppe, die durch Kombination aus hohem Apo AI $\geq 1,44$ g/l und niedrigem Apo B $\leq 1,24$ g/l ($p = 0,015$) gekennzeichnet war (Tab. 22).

Bei der Untersuchung der Assoziation zwischen den VNTR-Genotypen und dem Risiko für einen MI zeigte sich, dass die Heterozygoten in der Gruppe der MI-Patienten überrepräsentiert waren. Die Heterozygoten hatten somit in dieser Gruppe ein höheres MI-Risiko, das offensichtlich unabhängig von der absoluten Länge der VNTR-Variablen auf der Thrombozytenoberfläche war.

Tab. 22: Heterozygote Genpolymorphismen als Risikofaktoren des Myokardinfarkts in Niedrigrisikogruppen mit günstigem Lipidprofil

Niedrigrisiko- gruppe	Heterozygote		Homozygote		p
	Kontrollgruppe	+MI Patienten	Kontrollgruppe	+MI Patienten	
Apo AI $\geq 1,44$ g/l	54	144	180	305	0,058
Apo B $\leq 1,24$ g/l	82	145	261	327	0,029
Apo AI $\geq 1,44$ g/l + Apo B $\leq 1,24$ g/l	37	54	128	125	0,015

Die Diagnose des MI erfolgte nach den WHO-Kriterien (Braunwald, Circulation 1989). Die statistische Beziehung des Längenpolymorphismus VNTR zum Risiko des MI wurde mit Hilfe der multiplen logistischen Regression unter Berücksichtigung der etablierten Risikofaktoren bestimmt. Signifikanz $p < 0,05$. Abkürzungen: Apo AI: Apolipoprotein AI; Apo B: Apolipoprotein B; +MI: koronarangiographierte Patienten mit mindestens einem Myokardinfarkt; p: Signifikanz

5. Diskussion

5.1. *Der thrombozytäre Glykoprotein Ib-IX-V-Komplex: Struktur, Funktion und Lokalisation des Längenpolymorphismus „variable number of tandem Repeats“*

Die zentrale Rolle der Thrombozyten bei der Entstehung der koronaren Herzkrankheit (KHK) und ihrer Komplikationen, wie z.B. einen Myokardinfarkt (MI), zeigt sich unter anderem bei der klinischen Wirksamkeit der Thrombozytenaggregationshemmung gegen das Glykoprotein IIb-IIIa (GPIIb-IIIa) auf Thrombozyten (Murata, 1998).

Es ist immer noch nicht genau bekannt, in welcher Weise die Thrombozyten zur Entstehung der Atherosklerose und der sich daraus entwickelnden KHK beitragen (Murata, 1998). Es wird vermutet, dass die Thrombozyten durch Anbinden des Glykoprotein-Ib-IX-V-Komplexes (GPIb-IX-V-Komplex) an das verletzte Endothel oder subendotheliale Gewebe und darauf folgende Freisetzung von Wachstumsfaktoren die Entstehung der Atherosklerose fördern (Murata, 1998/ Reiner, 2001). Zusätzlich wird eine entzündliche Komponente mit lokaler Infiltration durch Leukozyten angenommen (Massberg, 2002/ Nieswandt, 2005). Massberg et al. konnten in vivo die wichtige Rolle des GP Ib-IX-V bei der Initiation des atherogenetischen Prozesses zeigen. Eine Behandlung von Apo E -defekten Mäusen mit Anti-GP Ib α reduzierte die Bildung einer atherosklerotischen Läsion deutlich (Massberg, 2002). Aufgrund dessen ist es sinnvoll, die verschiedenen thrombozytären Polymorphismen und ihren Einfluss auf das KHK- bzw. MI-Risiko zu untersuchen.

Der GPIb-IX-V-Komplex ist einer der wichtigsten Rezeptoren auf den Thrombozyten. Dieser Rezeptor dient als ein wichtiger Kontaktpunkt zwischen den Thrombozyten und der verletzten oder atherosklerotisch veränderten Gefäßwand (Lopez, 1994 (a)).

Die Gene für die Glykoproteine (GP) des Komplexes sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert: GPIb α auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p12), GPIb β auf dem langen Arm von Chromosom 22 (22q11.2), GPIX und GPV auf dem langen Arm von Chromosom 3 (3q21 bzw. 3q29) (Lopez, 1998/ Roth, 1996).

Eine der wichtigsten Untereinheiten dieses Komplexes ist das GPIb α (Ishida, 1995/Clemetson, 1997/ Englund, 2001/ Mazzucato, 1996/ Huizinga, 2002), welches als Bindungsstelle für den von-Willebrand-Faktor (vWF) und Thrombin fungiert (Lopez,

1998/ Kaski, 1996/ Nurden, 1995/ Lopez, 1994 (a)/ Huizinga, 2002). Das GPIIb α enthält eine mucinreiche Makroglykopeptidregion, die polymorph ist (Ishida, 1995/ Kaski, 1996/ Nurden, 1995/ Clemetson, 1997/ Lopez, 1994 (a)/ Lopez, 1998/ Li, 2002). Diese Region enthält den Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ (VNTR), welcher vier verschiedene Allele kodiert (Lopez, 1992/ Lopez, 1998/ Nurden, 1995/ Reiner, 2001). Dieser Längenpolymorphismus des GPIIb α führt zu unterschiedlichen Molekulargewichten der GPIIb α -Untereinheit, welche sich durch verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten in der Elektrophorese auszeichnen (Lopez, 1992/ Lopez, 1998/ Nurden, 1995/ Reiner, 2001).

Die Isoform A ist mit vier Repeats die längste, während die Isoform D mit nur einem Repeat die kürzeste Variante darstellt (Nurden, 1995). Die längste Variante A wurde bisher vor allem bei Asiaten, insbesondere bei Japanern, gefunden (Ishida, 1995/ Meyer, 1990/ Ishida, 1996).

Theoretisch könnte die unterschiedliche Anzahl der Repeats und damit die Länge des Moleküls die Interaktion zwischen GPIIb α mit dem Liganden vWF verändern (Ishida, 1995/ Lopez, 1998/ Lopez, 1992) und dadurch die Empfänglichkeit der Thrombozyten für eine scherkraftinduzierte Aktivierung vor allem in stenosierten Gefäßen beeinflussen (Lopez, 1992). Mehr noch könnte der Längenunterschied der beiden Allele bei Heterozygoten zu einer festeren Bindung an den vWF im Subendothel führen, und damit zu einem erhöhten Risiko der heterozygoten Merkmalsträger für ein thromboembolisches Ereignis (Afshar-Kharghan, 2004).

5.2. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Assoziation zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR des thrombozytären GPIIb/IIIa und dem Risiko für KHK und MI untersucht. Hierzu wurde eine Gruppe herzgesunder männlicher Kontrollpersonen (n = 469) und koronarangiographierter männlichen Patienten (n = 2272) mit einer KHK bzw. mindestens einem überlebten MI untersucht (alles Mitteleuropäer). Mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden die DNA-Proben der Kontrollpersonen und Patienten hinsichtlich des Längenpolymorphismus VNTR des GPIIb/IIIa genotypisiert. Durch die Identifikation der etablierten Risikofaktoren für die KHK und den MI in der vorliegenden Population wie Alter, Cholesterin, Triglyzeride, Apolipoprotein B (Apo B), Lipoprotein (a) (Lp(a)), Diabetes mellitus, Hypertonus, Body Mass Index (BMI), Rauchen und dem kardioprotektiven Faktor Apolipoprotein AI (Apo AI) wird der repräsentative Wert dieser Studie unterstrichen. Diese Risikofaktoren wurden auch in anderen Studien gefunden (Mikkelsen, 2001/ Rosenberg, 2002/ Ito, 1999/ Murata, 1997/ Ozelo, 2004 (b)/ Mercier, 2000).

Durch die Mittelwerte bzw. das Fehlen/ Vorhandensein der oben genannten Risikofaktoren der KHK bzw. des MI konnte die Studienpopulation in Hoch- und Niedrigrisikogruppen eingeteilt werden (siehe 3.5.).

Die ausgeprägte Assoziation zwischen der KHK und dem MI konnte in der vorliegenden Arbeit nachvollzogen werden ($p < 0,000$).

Es konnte weder in der gesamten Studienpopulation noch in den definierten Hoch- und Niedrigrisikogruppen (siehe 3.5.) eine Assoziation zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem Risiko für eine KHK bzw. einen MI gefunden werden. Dagegen zeigte sich beim Vergleich der Heterozygoten mit den Homozygoten in der Gesamtpopulation eine Tendenz zur Überrepräsentation der heterozygoten Individuen in der KHK- bzw. MI-Gruppe (jeweils $p = 0,068$).

In den Niedrigrisikogruppen mit günstigem, kardioprotektivem Lipidprofil [hohem Apo AI ($> 1,44$ g/l), niedrigem Apo B ($< 1,26$ g/l), hohem Apo AI ($> 1,44$ g/l) plus niedrigem Apo B ($< 1,24$ g/l)] konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen den heterozygoten Varianten des Längenpolymorphismus VNTR und dem Risiko für die KHK bzw. den MI, nicht jedoch für den Ausprägungsgrad der KHK gefunden werden.

Das Ausmaß der KHK wurde über die Anzahl der betroffenen Gefäße (1-, 2- und 3-Gefäßerkrankung) bzw. über den Gensini-Score definiert (Gensini, 1983).

Somit waren sowohl bei der KHK als auch bei dem MI in den Niedrigrisikogruppen mit günstigem, kardioprotektivem Lipidprofil die Heterozygoten überrepräsentiert, d.h. heterozygote Merkmalsträger bezüglich des Längenpolymorphismus VNTR des GPIb α sind gefährdeter eine KHK zu entwickeln bzw. einen MI zu erleiden als Homozygote.

5.3. Stellen die heterozygoten Genotypen des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha einen unabhängigen Risikofaktor für die koronare Herzkrankheit bzw. den Myokardinfarkt dar?

5.3.1. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN LÄNGENPOLYMORPHISMUS „VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEATS“ DES GLYKOPROTEINS IB ALPHA UND DEM RISIKO FÜR EINE KORONARE HERZKRANKHEIT

Murata und Mitarbeiter (Murata, 1997) fanden bei 91 japanischen Patienten (66 mit MI, 25 mit Angina pectoris; 64 männliche, 27 weibliche Patienten) und 105 Kontrollpersonen (95 Männer, 20 Frauen) einen Zusammenhang zwischen den längeren Allelen A und B des Längenpolymorphismus VNTR des GPIb α und der KHK ($p = 0,003$). Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem Schweregrad der KHK gefunden werden.

Die gleiche Arbeitsgruppe bestätigte in einer weiteren Studie an 78 japanischen Patienten mit Angina pectoris bzw. MI und 87 gesunden Probanden ihre zuvor gefundenen Ergebnisse mit einer Tendenz zu einer erhöhten Häufigkeit bei Vorhandensein mindestens eines A-Allels bei Patienten mit KHK im Vergleich zu gesunden Probanden ($p = 0,07$, odds ratio = 2,24) (Murata, 1998). Im Alter unter 60 Jahre war dieses Ergebnis hoch signifikant ($p = 0,008$, odds ratio = 3,54). Wurden alle Allelfrequenzen zwischen den unter 60-jährigen Kontrollpersonen und Patienten untersucht, so war die Differenz in der Frequenz des A-Allels signifikant ($p = 0,0195$). In der logistischen Regressionsanalyse zeigte sich mindestens ein vorhandenes A-Allel als unabhängiger Risikofaktor einer KHK ($p = 0,0043$, odds ratio = 7,94). Darüber hinaus fanden Murata et al. bei Patienten, die die Allele A und B tragen, eine höhere

Anzahl befallener Koronargefäße bzw. einen höheren Gensini-Score (Gensini, 1983/ Murata, 1998).

Gonzalez-Conejero und Mitarbeiter (Gonzalez-Conejero, 1998) beobachteten dagegen eine erhöhte Frequenz des BC-Genotyps bei Patienten mit KHK ($p = 0,0047$, odds ratio = 2,84, KI = 1,28-6,41) bei 104 Patienten mit einer zerebrovaskulären Erkrankung (54 Männer, 50 Frauen) (31 Patienten mit transitorischer ischämischer Attacke (TIA), 44 mit kleinerem Schlaganfall, 29 mit zerebralem Infarkt), 101 KHK-Patienten (74 Männer, 27 Frauen) (69 mit MI, 32 mit instabiler Angina pectoris), 95 Patienten mit einer tiefen Venenthrombose (54 Männer, 41 Frauen) und 300 gesunden Probanden (182 Männer, 118 Frauen). Das B-Allel konnte zwar vermehrt bei den KHK-Patienten gefunden werden, erreichte allerdings keine statistische Signifikanz ($p = 0,0878$, odds ratio = 1,71, KI = 0,88-3,35). Der Längenpolymorphismus VNTR konnte als unabhängiger Risikofaktor für eine KHK nicht nachgewiesen werden.

Im Jahr 2001 untersuchten Mikkelsen et al. (Mikkelsen, 2001) 700 finnische Männer mittleren Alters post mortem, welche plötzlich verstorben waren (Helsinki Sudden Death Study). Bei allen Probanden erfolgte eine Autopsie. Die Studie umfasste 230 KHK-Patienten, 58 Patienten mit anderen kardialen Erkrankungen wie z.B. einer Kardiomyopathie, Erkrankungen anderer Art ($n = 140$), 272 durch einen Unfall Verstorbenen bzw. Suizide. Sie fanden eine erhöhte Frequenz des HPA-2-Met/-VNTR-B Haplotyps bei Patienten unter 55 Jahren, die an einem plötzlichen Herztod verstorben waren ($p < 0,001$, odds ratio = 2,2, KI = 1,3-3,7). Ebenso fand sich vermehrt der HPA-2-Met/-VNTR-B-Haplotyp unter den Patienten mit einem akuten MI ($p < 0,005$, odds ratio = 2,0, KI = 1,1-3,7), und Patienten mit koronarer Thrombose ($p < 0,005$, odds ratio = 2,6, KI = 1,3-5,3). In der Altersgruppe unter 55 Jahren zeigte sich der HPA-2-Met/-VNTR-B-Haplotyp vermehrt bei Patienten mit einer koronaren Thrombose (odds ratio = 9,2, KI = 2,4-35,0), sowie bei Patienten, die an einem akuten MI verstorben waren (odds ratio = 5,6, KI = 1,8-17,3). Ebenso ließ sich der HPA-2-Met/-VNTR-B-Haplotyp in dieser Altersgruppe häufiger bei Patienten nachweisen, die an einem plötzlichen Herztod aufgrund eines akuten MI, solchen, die an einem plötzlichen Herztod aufgrund einer KHK aber ohne eine akute Läsion, und solchen, die an einem akuten Herztod

aufgrund einer anderen Ursache als einer KHK verstorben waren ($p < 0,005$, $p < 0,01$, bzw. $p < 0,005$, odds ratio = 3,5, 8,8, bzw. 5,4).

In der Gesamtpopulation ließ sich kein Zusammenhang zwischen HPA-2-Met/-VNTR-B-Haplotyp und der Ausprägung der KHK erkennen. Auch hier zeigte sich in der Altersgruppe unter 55 Jahren eine Assoziation zwischen HPA-2-Met/VNTR-B-Haplotyp und der Koronarstenose ($p < 0,005$) und den erhabenen Koronarläsionen ($p = 0,05$).

Mikkelsson et al. (Mikkelsson, 2001) schlossen aufgrund des in ihrer Studie gefundenen fast kompletten Kopplungsungleichgewichts zwischen dem Dimorphismus Thr/Met¹⁴⁵ (HPA-2), einem weiteren Polymorphismus des GPIIb α , und Längenpolymorphismus VNTR von der Assoziation zwischen HPA-2-Met und plötzlichem Herztod bei Männern < 55 Jahre, akutem MI und koronarer Thrombose auf dieselbe Assoziation mit VNTR-B. Ein Kopplungsungleichgewicht zwischen dem Dimorphismus Thr/Met¹⁴⁵ (HPA-2) und dem Längenpolymorphismus VNTR konnte in vorliegenden Studie nicht gefunden werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Ito et al. (Ito, 1999) bestimmten den Längenpolymorphismus VNTR von 158 Patienten (108 mit MI, 16 mit instabiler Angina pectoris, 34 mit stabiler Angina pectoris) und 169 gesunden Kontrollpersonen mit normalem EKG und ohne kardiale Anamnese. Unter den Patienten befanden sich 135 Männer und 23 Frauen, bei den gesunden Probanden 122 Männer und 47 Frauen. Die Arbeitsgruppe konnte keine Assoziation zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und der KHK zeigen. Ebenso beobachteten Ito et al. keinen Zusammenhang zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und der Ausprägung der KHK in Bezug auf die Anzahl der erkrankten Gefäße. Die Patienten wurden in 2 Gruppen eingeteilt: 124 mit akutem Koronarsyndrom und 34 mit stabiler Angina pectoris. Hier ließ sich in der logistischen Regression ein vermehrtes Auftreten des A-Allels bei Patienten mit stabiler Angina pectoris im Vergleich zu den Kontrollpersonen nachweisen ($p < 0,05$, odds ratio = 2,25, KI = 1,01-5,00).

Afshar-Kharghan et al. (Afshar-Kharghan, 2004) führten eine Studie mit insgesamt 15792 Männer und Frauen zwischen 45 und 64 Jahren zur Assoziation des Längenpolymorphismus VNTR zum Risiko der KHK durch. Die Studienpopulation bestand aus 2 ethnischen Gruppen, den Afro-Amerikanern und den Kaukasiern. Die

KHK wurde durch 1) einen definitiven oder möglichen MI, 2) einen stillen MI mit neu aufgetretenen EKG-Veränderungen zwischen den Untersuchungen, 3) den Tod aufgrund einer KHK bzw. 4) einen Eingriff zur koronaren Revaskularisation definiert. Die Kontrollgruppe bestand aus Personen, bei denen eine geringe durchschnittliche Intima-Media-Dicke der Carotiden vorlag. Aufgrund der unterschiedlichen Genotypverteilung bei verschiedenen Rassen erfolgte eine separate Untersuchung der Afro-Amerikaner und der Kaukasier. In der Gesamtpopulation konnte kein Zusammenhang zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem Risiko einer KHK gefunden werden. Wurden die beiden ethnischen Gruppen getrennt voneinander betrachtet, so zeigte sich ein erniedrigtes Risiko für eine KHK bei Afro-Amerikanern mit dem homozygoten Genotyp CC im Vergleich zu BC+BB bzw. CD+DD ($p = 0,014$ für CC versus BC + BB, odds ratio = 5,6, KI = 1,2-26,6; $p = 0,0001$ für CC versus CD + DD, odds ratio = 21,7, KI = 4,3-108,8).

Bei den Kaukasiern dagegen zeigte sich keine Assoziation zwischen den Genotypen BC + BB (odds ratio = 1,1, KI = 0,4-2,6) bzw. CD + DD (odds ratio = 1,4, KI = 0,8-3,1) zum KHK-Risiko. Da die meisten nicht CC-Genotyp-Träger unter den Afro-Amerikanern heterozygot für 2 andere Längenvarianten waren, stellen Afshar-Kharghan et al. damit die These auf, dass eventuell eine unterschiedliche Länge des GPIIb α -Moleküls die Interaktion mit dem vWF im subintimalen Gewebe beeinflussen könnte, und damit das Risiko für eine KHK erhöht ist.

5.3.2. *ZUSAMMENHANG ZWISCHEN LÄNGENPOLYMORPHISMUS „VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEATS“ DES GLYKOPROTEINS IB ALPHA UND DEM RISIKO FÜR EINEN MYOKARDINFARKT*

Ozelo und Mitarbeiter (Ozelo, 2004 (b)) bestimmten die VNTR-Genotypen von 180 brasilianischen Patienten, die mindestens einen MI überlebt hatten, und 180 gesunden Probanden ohne kardiale Voranamnese. Bei 155 der 180 Patienten erfolgte eine Koronarangiographie. Der heterozygote Genotyp CD ließ sich vermehrt in der Patientengruppe nachweisen ($p = 0,02$, odds ratio 2,36, KI = 1,10-5,16). In der logistischen Regressionsanalyse zeigte sich der CD-Genotyp als unabhängiger Risikofaktor für einen MI ($p = 0,01$). Hingegen kam der heterozygote Genotyp BC in dieser Studienpopulation bei Patienten mit einem MI im Vergleich zu den

Kontrollpersonen seltener vor, und erschien hier als protektiver Faktor ($p = 0,007$, odds ratio = 0,47, KI = 0,27-0,82). In der logistischen Regressionsanalyse erschien der Genotyp BC als unabhängiger, protektiver Faktor für einen MI ($p = 0,04$). Auch das B-Allel ließ sich seltener bei Patienten als bei den gesunden Kontrollpersonen nachweisen ($p = 0,02$, odds ratio 0,58, KI = 0,35-0,94).

In ihrer Studienpopulation beobachteten Ozelo et al. eine Assoziation zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem Ausmaß der KHK. Hier zeigte sich eine höhere Anzahl erkrankter Gefäße bei den heterozygoten Genotypen CD und BC (CD: $p = 0,026$, odds ratio = 4,0; BC: $p = 0,035$, odds ratio = 3,39), sowie dem D-Allel ($p = 0,019$, odds ratio = 3,47). Ozelo et al. fanden eine geringere Ausprägung der KHK bei C-Allel-Trägern ($p = 0,003$, odds ratio = 0,27) bzw. dem Genotyp CC ($p = 0,0009$, odds ratio = 0,18) (Ozelo, 2004 (b)).

Mercier et al. (Mercier, 2000) untersuchten eine gemischtgeschlechtliche Population von 149 mitteleuropäischen MI-Patienten (133 Männer und 16 Frauen) und 207 Kontrollpersonen (Knochenmarkspender) ohne den Nachweis einer Assoziation zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem MI-Risiko.

Rosenberg et al. (Rosenberg, 2002) nahmen in ihre Studie 100 Männer mit einem akuten MI vor dem 53. Lebensjahr und 119 gesunde Kontrollpersonen mit einem normalen EKG und ohne kardiale Voranamnese auf. Sie fanden bei ihren Untersuchungen ein vermehrtes Vorkommen des A- und B-Allels in der Patientengruppe, dies war allerdings nicht statistisch signifikant (odds ratio = 1,20, KI = 0,92-1,57).

Bei Douglas et al. (Douglas, 2002) bestand die Studienpopulation aus 256 koronarangiographierten Personen (180 Männer, 76 Frauen; 180 Kaukasier, 75 Inder bzw. Asiaten). Von diesen Personen hatten 88 mindestens einen MI überlebt. Die anderen 168 Personen stellten die Kontrollgruppe ohne MI dar, mit normalen oder erkrankten Koronargefäßen. Die Arbeitsgruppe um Douglas sah keine Assoziation zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem MI-Risiko in der Gesamtpopulation, dagegen zeigte sich im Vergleich des CC-Genotyps zu allen anderen Genotypen eine Tendenz zur Überrepresentation in der MI-Patientengruppe ($p = 0,059$,

odds ratio = 1,80, KI = 0,94-3,48). Ein Zusammenhang zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und der Ausprägung der KHK ließ sich nicht nachweisen.

Die Arbeitsgruppe um Kenny untersuchte 2002 (Kenny, 2002) eine Gruppe von 1014 Patienten auf eine mögliche Assoziation zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem Risiko für einen MI. Folgende Patienten wurden in die Studie aufgenommen: akuter MI oder instabile Angina pectoris. Die Patienten wurden randomisiert, eine Gruppe erhielt den GP-IIb/ IIIa-Antagonisten Orbofiban, die andere ein Placebo. Die Mehrzahl der Patienten waren Kaukasier (n = 924), 30 Afrikaner, 20 Asiaten, 37 Hispanier und 3 gemischter Ethnität. Die Follow-up-Zeit betrug mindestens 230 Tage und maximal 572 Tage. 33 Patienten erlitten einen weiteren MI, 55 erhielten eine Revaskularisationsmaßnahme, 72 hatten eine erneute Ischämie, 6 Patienten erlitten einen Schlaganfall und 3 verstarben. Die Endpunkte der Untersuchung waren: 1) MI, Revaskularisationsmaßnahme bei nachgewiesener Ischämie, wiederkehrende Ischämie, Tod und Schlaganfall, 2) MI alleine. Um mögliche rassenspezifische genetische Unterschiede auszuschließen, wurde die weitere Analyse nur auf die Gruppe der Kaukasier bezogen. Eine Assoziation zwischen den häufigsten VNTR-Genotypen BC, CC und CD und den definierten Endpunkten ließ sich nicht nachweisen ($p = 0,59$), auch nicht beim Vergleich von behandelter Patientengruppe und Placebogruppe ($p = 0,41$). Dagegen bestand ein Zusammenhang zwischen dem D-Allel und dem Risiko für einen MI ($p = 0,05$), allerdings nicht zum homozygoten DD-Genotyp. Kenny et al. beobachteten eine Assoziation zwischen dem MI-Risiko und dem gleichzeitigen Auftreten des D-Allels und dem -5C-Kozak-Allel ($p = 0,04$).

5.4. Mögliche Erklärungen für die unterschiedlichen Studienergebnisse

Sowohl in Hinblick auf eine mögliche Assoziation zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR des GP Ib α und dem Risiko einer KHK als auch dem Risiko für einen MI ergaben die bisher vorliegenden Studien widersprüchliche Ergebnisse. *“Kleine Studiengröße, alle möglichen Art von Bias, und viele andere Aspekte können zu dieser Situation beitragen, inklusive Unterschiede in den Studiendesigns, in den Definitionen der Phänotypen oder des Endpunktes, in den*

Studienpopulationen, in den ethnischen Aufteilungen und in den ausgewählten Kontrollen.

Für die meisten der Polymorphismen zeigen sich widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf die Assoziation mit klinischen Endpunkten. Dies ist ein nahezu universelles Ergebnis. Dies sollte nicht überraschen, angesichts der Tatsache der hohen Frequenzen der verschiedenen Allele, welche die Mutationen als Polymorphismen definieren. Dies an sich ist ein Argument gegen eine starke Assoziation irgendeiner Variante mit einer Erkrankung. Einzelne Genpolymorphismen der thrombozytären Glykoproteinrezeptoren tragen nur zu einem kleinen Teil des individuellen kardiovaskulären Risikos bei“ (Meisel, 2004).

Folgende Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem Risiko für eine KHK: Murata et al. (Murata, 1997), Murata et al. (Murata, 1998), Gonzalez-Conejero et al. (Gonzalez-Conejero, 1998) und Mikkelsen et al. (Mikkelsen, 2001).

Afshar-Kharghan et al. (Afshar-Kharghan, 2004) fanden ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem Risiko für eine KHK, allerdings im positiven Sinne, dass Afro-Amerikaner mit einem homozygoten Genotyp CC ein geringeres Risiko haben, an einer KHK zu erkranken.

Als einzige Arbeitsgruppe konnten Ito et al. (Ito, 1999) keine Assoziation zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem Risiko für eine KHK zeigen.

Ebenso zeigten die Studien zur Assoziation zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem Risiko für einen MI divergierende Ergebnisse. Eine Verbindung zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem Risiko für einen MI stellten fest: Ozelo et al. (Ozelo, Origa, 2004), Douglas et al. (Douglas, 2002) und Kenny et al. (Kenny, 2002). Rosenberg et al. (Rosenberg, 2002) fanden ein vermehrtes Vorkommen der A- und B-Allele bei Patienten mit einem MI, allerdings ohne statistische Signifikanz.

Keinen Zusammenhang zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem Risiko für einen MI fanden dagegen Mercier et al. (Mercier, 2000).

5.4.1. STUDIENDESIGN

Als einzige Studie untersuchten Mikkelsen und Mitarbeiter (Mikkelsen, 2001) den Zusammenhang zwischen den beiden Polymorphismen des GPIIb/IIIa, dem Längenpolymorphismus VNTR und dem Dimorphismus Thr/Met¹⁴⁵ (HPA-2) zum Risiko für eine KHK, einen MI, eine koronare Arterienstenose und den plötzlichen Herztod an 700 verstorbenen Männern. Alle anderen Studien - die vorliegende Arbeit eingeschlossen - führten die Genotypisierungen an Überlebenden eines kardialen Ereignisses durch. Die ausschließlichen Untersuchungen von Überlebenden oder Verstorbenen eines kardialen Ereignisses beinhalten unterschiedliche Fragestellungen, da ein überlebtes kardiales Ereignis ein anderes Risiko als ein tödliches kardiales Ereignis darstellt (Mikkelsen, 2001/ Gonzalez-Conejero, 1998). *„Um den Überlebensbias zu verringern, sollten in Assoziationsstudien die Patienten und Kontrollpersonen in etwa dem gleichen Alter sein und über eine ähnliche Zeitspanne nach beobachtet werden, gerade wenn das untersuchte Gen in Verdacht steht, die Mortalität zu beeinflussen“* (Ridker, 1999). Die Untersuchungen von Genpolymorphismen an Überlebenden von arteriellen thrombotischen Ereignissen könnten zu einer Unterschätzung des klinischen Risikos dieser prothrombotischen Genpolymorphismen führen (Gonzalez-Conejero, 1998).

5.4.2. DEFINITION UNTERSCHIEDLICHER SUBGRUPPEN

Die KHK ist eine multifaktorielle Erkrankung. Die etablierten Risikofaktoren umfassen den Lipidmetabolismus, Diabetes mellitus, Hypertonus, Rauchen, Alter und BMI.

Aufgrund der Tatsache, dass der Lipidmetabolismus einer der Hauptrisikofaktoren der KHK ist (Homma, 2004), welcher leicht den Effekt von Thrombozytenpolymorphismen überdecken kann, wurde der Längenpolymorphismus VNTR und das Risiko für eine KHK bzw. einen MI in der vorliegenden Studie in Niedrigrisikogruppen mit günstigem, kardioprotektivem Lipidprofil untersucht. Nur drei der anderen Studien definierten Hoch- und Niedrigrisikogruppen, wobei sich diese auf das Alter bezogen (Mikkelsen, 2001/ Murata, 1997/ Murata, 1998).

Alle anderen Studien (Ito, 1999/ Rosenberg, 2002/ Mercier, 2000/ Gonzalez-Conejero, 1998/ Afshar-Kharghan, 2004/ Douglas, 2002/ Ozelo, 2004 (b)/ Kenny, 2002)

untersuchten hingegen den Zusammenhang zwischen dem Längenpolymorphismus VNTR und dem Risiko für eine KHK bzw. einen MI in der Gesamtbevölkerung, ohne diese in Hoch- und Niedrigrisikogruppen einzuteilen.

Der relative Einfluss von Thrombozytenpolymorphismen könnte abhängig von multiplen Faktoren wie Alter, Geschlecht, Rauchen, Diabetes, Lipidmetabolismus und Medikamenteneinnahme variieren (Kanzari, 2001/ Meisel, 2004). Vor allem die Tatsache- wie oben erwähnt - dass der Lipidmetabolismus als Hauptrisikofaktor der KHK leicht den Effekt der Thrombozytenpolymorphismen überdecken kann, macht es, wie in der vorliegenden Studie geschehen, notwendig, den Einfluss des Längenpolymorphismus VNTR in Niedrigrisikogruppen, wie z.B. in solchen mit günstigem Lipidprofil, zu untersuchen. Die thrombozytären Polymorphismen sind eine viel versprechende Ergänzung zu den etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren, sollten aber immer im Kontext mit den anderen nicht-genetischen Risikofaktoren gesehen werden (Kandzari, 2001).

5.4.3. *ERFASSUNG UND DEFINITION DER DIAGNOSE*

Ein weiterer Unterschied ergab sich durch die Diagnostik und Definition der KHK bzw. des MI.

In einigen Studien erfolgte die Diagnose eines MI durch die WHO-Kriterien (EKG-Veränderungen, erhöhte Kreatinphosphokinase, typischer Brustschmerz) (Braunwald, 1989): Murata et al. (Murata, 1997), Gonzalez-Conejero et al. (Gonzalez-Conejero, 1998) und Ito et al. (Ito, 1999).

Bei vier der Studien (Gonzalez-Conejero, 1998/ Mercier, 2000/ Rosenberg, 2002/ Murata, 1998) wurde keine Koronarangiographie durchgeführt.

Gonzalez-Conejero et al. definierten - wie bereits erwähnt - den MI bzw. die instabile Angina pectoris nach den WHO-Kriterien (EKG, Laborparameter, typischer Brustschmerz) (Braunwald, 1989).

Mercier et al. machten hierbei keinerlei Angaben bezüglich der Diagnostik der KHK bzw. des MI (Mercier, 2000), Murata et al. erwähnten nur den Einschluss von Patienten mit einem MI bzw. einer Angina pectoris, ohne nähere Angaben bezüglich der Diagnostik zu machen (Murata, 1998).

Rosenberg et al. definierten den MI nach der Cardiovascular Health Study (Fried, 1991): a) Q-Wellen-MI, oder b) thorakaler Schmerz sowie abnormale Herzenzyme und entweder c) ST-T-Muster oder d) neu aufgetretener Linksschenkelblock. Die Angina pectoris wurde ebenfalls nach der Cardiovascular Health Study (Fried, 1991) definiert: a) Koronararterienbypass oder b) $\geq 70\%$ Koronararterienstenose einer der Koronarien, oder c) ST-Streckensenkung $> 1\text{mm}$ unter Belastung und positiver Rose Fragebogen (Rose, 1962), oder d) ärztlich diagnostizierte Angina pectoris und entsprechende Medikation (Nitrate, Beta-Blocker oder Calcium-Kanal-Blocker) (Fried, 1991/ Rosenberg, 2002).

Die Arbeitsgruppe um Kenny schloss in ihre Studie Patienten mit einem akuten MI oder einer instabilen Angina pectoris ein, die einen Ischämieschmerz in Ruhe > 5 Minuten in den letzten 72 Stunden vor Aufnahme zeigten und ein oder mehrere der folgenden Kriterien erfüllten: a) neue oder vermutlich neue ST-Streckenveränderung $\geq 0,5\text{ mm}$, b) T-Wellen-Senkung $\geq 3\text{mm}$ in 3 Ableitungen oder Linksschenkelblock, c) positive kardiale Marker, d) MI in der Voranamnese, e) Koronarbypass in der Voranamnese,

f) Koronarstenose > 50%, g) Alter über 65 Jahre und eine bekannte Angina pectoris oder ein positiver Stresstest, h) vorbekannte periphere arterielle Verschlusskrankheit oder zerebrovaskuläre Erkrankung, i) bekannter Diabetes mellitus (Kenny, 2002). Kenny et al. machten keine Angaben über die Anzahl der koronarangiographierten Patienten bzw. die Einteilung in 1-, 2- und 3-Gefäßerkrankung bzw. den Gensini-Score (Kenny, 2002).

Bei Afshar-Kharghan et al. wurden zum Teil Revaskularisationen durchgeführt, welche eine Koronarangiographie einschlossen (Afshar-Kharghan, 2004). Es fehlten Angaben zur Definition einer Stenose (> 50% oder > 75%) sowie eine Schweregradeinteilung (Anzahl der befallenen Gefäße oder Gensini-Score). Es wurden allerdings nicht alle Patienten koronarangiographiert. Die KHK wurde in dieser Arbeit über a) einen definitiven bzw. möglichen MI, b) einen stummen MI über neu aufgetretene EKG-Veränderungen, c) einen Herztod oder d) die bereits erwähnten Revaskularisationsmaßnahmen definiert (Afshar-Kharghan, 2004).

Bei den anderen Untersuchungen wurde zwar eine Koronarangiographie (bei fast allen Patienten) durchgeführt, aber zum Teil traten hier Unterschiede bei der Definition der KHK auf (Ito, 1999/ Ozleo, 2004 (b)/ Douglas, 2002).

Ito et al. (Ito, 1999) teilten in 1-, 2- und 3-Gefäßerkrankung ein. Allerdings lag bei dieser Arbeitsgruppe eine Stenose erst ab 75% vor (Klassifikation der American Heart Association). Die Diagnose eines MI wurde entsprechend den WHO-Kriterien gestellt (Ito, 1999).

Nur bei Murata et al., Douglas et al. und Ozelo et al. wurden wie in der vorliegenden Untersuchung eine Stenose > 50% als erkrankt definiert (Murata 1997/ Ozelo, 2004 (b)/ Douglas, 2002), sowie eine Einteilung in 1-, 2- und 3-Gefäßerkrankung vorgenommen (Ozelo, 2004 (b)/Murata, 1997) und der Gensini-Score bestimmt (Murata, 1997).

In der Studie von Mikkelsen et al. erfolgte die Diagnose des MI post mortem aufgrund histologischer Untersuchungen des Myokardiums. Hierbei deuteten vorhandene neutrophile Granulozyten auf einen akuten MI hin, dagegen wurde vorhandenes fibröses Narbengewebe als abgelaufener, alter MI gewertet. Über Ausgussmodelle der 3 Hauptstämme der Koronararterien wurde die prozentuale Verengung der Stenosen beurteilt. Es wurden keine Angaben bezüglich Anzahl der erkrankten Gefäße oder den Gensini-Score gemacht (Mikkelsen, 2001).

5.4.4. *GESCHLECHTSUNTERSCHIEDE*

In mehreren der vorliegenden Studien waren die untersuchten Populationen nicht einheitlich. So schlossen mehrere Arbeitsgruppen sowohl Männer als auch Frauen in ihre Untersuchungen mit ein, wobei die Anzahl der Männer überwog: Douglas et al. (Douglas, 2002), Murata et al. (Murata, 1997), Ito et al. (Ito, 1999), Kenny et al. (Kenny, 2002), Gonzalez-Conejero et al. (Gonzalez-Conejero, 1998), Mercier et al. (Mercier, 2000) und Afshar-Kharghan et al. (Afshar-Kharghan, 2004).

Keine Angaben bezüglich des Geschlechts der Probanden lagen dagegen bei den Studien von Ozelo et al. (Ozelo, 2004 (b)) und Murata et al. (Murata, 1998) vor.

Einzig die Arbeitsgruppen um Rosenberg et al. und Mikkelsen et al. schlossen wie in der vorliegenden Arbeit nur Männer in ihre Untersuchungen ein (Rosenberg, 2002/ Mikkelsen, 2001).

Dabei ist der Unterschied im Risikoprofil durch den etablierten und unbeeinflussbaren kardialen Risikofaktor männliches Geschlecht zu beachten (Winkelmann, 2000/ Murata, 1998). Um das Risikoprofil hinsichtlich des Geschlechts gleich zu halten, wurden in die hier vorliegende Studie nur Männer aufgenommen.

5.4.5. *RASSENUNTERSCHIEDE*

Bei genetischen Assoziationsstudien ist die unterschiedliche Verteilung der Allelfrequenzen zwischen den einzelnen Rassen zu beachten (Ridker, 1999/ Ozelo, 2004 (a)). Dies hat sich z.B. auch bei der Untersuchung der aktivierten Protein C-Resistenz in der japanischen Bevölkerung gezeigt (Zama, 1996). Auch hier lag eine unterschiedliche Prävalenz dieser Mutation in der japanischen Bevölkerung im Vergleich zu Kaukasiern vor (Zama, 1996). Hinsichtlich der Allelfrequenzen bzw. der Genotypverteilung des Längenpolymorphismus VNTR gilt dies insbesondere für den Vergleich von Asiaten und Europäern, da das A-Allel bei Asiaten, und hier vor allem bei den Japanern, sehr viel häufiger als bei Europäern auftritt. So können Ergebnisse nicht ohne weiteres zwischen verschiedenen Bevölkerungen übertragen werden (Ridker, 1999/ Kenny, 2002).

5.4.6. KONTROLLGRUPPE

In den verschiedenen Studien wurden unterschiedliche Gruppen als Kontrollen herangezogen. Die meisten Studien verglichen die Patienten mit herzgesunden Kontrollpersonen ohne eine kardiovaskuläre Voranamnese und einem unauffälligen EKG: Rosenberg et al. (Rosenberg, 2002), Murata et al. (Murata, 1997), Murata et al. (Murata, 1998) und Ito et al. (Ito, 1999). Folgende Arbeitsgruppen verzichteten auf ein EKG: Ozelo et al. (Ozelo, 2004 (b)/, Mercier et al. (Mercier, 2000) und Gonzalez-Conejero et al. (Gonzalez-Conejero, 1998).

Douglas und Mitarbeiter teilten die Patienten in eine Gruppe mit und eine ohne MI ein, wobei letztgenannte Gruppe die Kontrollgruppe darstellte. Bei allen Patienten erfolgte eine Koronarangiographie (Douglas, 2002).

Afshar-Kharghan et al. dagegen zogen als Kontrollpersonen solche heran, die eine niedrige durchschnittliche Intima-Media-Dicke der Carotis auswiesen (Afshar-Kharghan, 2004).

In der Studie von Mikkelsen et al. stellten die Männer, die an anderen als kardiovaskulären Erkrankungen, sowie Unfällen und Suiziden verstorben waren, die Kontrollprobanden dar (Mikkelsen, 2001).

Kenny et al. definierten keine Kontrollgruppe (Kenny, 2002).

Zusätzlich waren in der Studie von Rosenberg et al. (Rosenberg, 2002) die Patienten- und Kontrollgruppen hinsichtlich ihrer Herkunft nicht einheitlich. Es waren z.B. statistisch signifikant mehr Kaukasier unter den MI-Patienten als bei den Kontrollpersonen (Patienten: 57% Kaukasier, Kontrollen: 30% Kaukasier).

5.4.7. STUDIENGRÖßE

Die unterschiedlichen Studienergebnisse sind auch durch die verschiedenen Größen der untersuchten Populationen zu erklären. „*Die Präzision der genetischen Assays reduziert nicht die Notwendigkeit großer Untersuchungen um zufällige Ergebnisse zu minimieren*“ (Ridker, Lancet 1999). Um enge Konfidenzintervalle für die Odds Ratios zu erreichen, benötigt man mehrere hundert Probanden, je nach Prävalenz der Mutation und Ausmaß des Effekts (Ridker, 1999).

Außer der Studie von Afshar-Kharghan et al. (Afshar-Kharghan, 2004), welche 15792 Probanden einschloss, umfasste keine der bisherigen Studien so viele Probanden wie die vorliegende Arbeit (insgesamt 2741 Probanden). 3 weitere Studien größeren Umfangs waren die von Kenny et al. (1014 Probanden) (Kenny, 2002), Mikkelsen et al. (700 Probanden) (Mikkelsen, 2001) sowie Gonzalez-Conejero et al. (600 Probanden) (Gonzalez-Conejero, 1998). Alle übrigen Studien lagen mit ihrer Probandenanzahl weit unter 500: Douglas et al. (256 Probanden) (Douglas, 2002), Ozelo et al. (360 Probanden) (Ozelo, 2004 (b)), Mercier et al. (356 Probanden) (Mercier, 2000), Ito et al. (327 Probanden) (Ito, 1999), Murata et al. (196 Probanden) (Murata, 1997), Murata et al. (165 Probanden) (Murata, 1998) und Rosenberg et al. (219 Probanden) (Rosenberg, 2002).

Diese zahlenmäßigen Unterschiede erklären sicherlich auch, dass z.B. das A-Allel in einigen europäischen Studien nicht gefunden wurde, obwohl es bei Europäern vorkommt (Mercier, 2000/ Gonzalez-Conejero, 1998).

5.4.8. DESIGN DER VORLIEGENDEN STUDIE

Da die vorliegende Studie retrospektiv durchgeführt wurde, wurden in die Studie nur Patienten aufgenommen, die ein kardiales Ereignis wie z.B. einen MI überlebt hatten.

Die Kontrollgruppe bestand zum einen Teil aus klinisch herzgesunden Probanden ohne kardiale Voranamnese. Zusätzlich bildeten aber auch die koronarangiographierten Patienten ohne Nachweis einer KHK (Stenose < 50%, 0-Gefäßerkrankung) bzw. eines MI eine weitere Kontrollgruppe. Hier lag also zusätzlich eine Kontrollgruppe vor, bei der der koronare Status genau bekannt war. Keine der bisherigen Studien schloss 2 Kontrollgruppen in ihre Betrachtungen mit ein. Bisher ist für den hier untersuchten

Polymorphismus noch unklar, inwieweit unterschiedliche Kontrollgruppen die Studienergebnisse beeinflussen.

Durch die große Studienpopulation bietet die vorliegende Untersuchung eine hohe statistische Sicherheit, welche sich in den engen Konfidenzintervallen zeigt.

Durch die Identifikation der etablierten Risikofaktoren für die KHK bzw. den MI in der vorliegenden Population wie Alter, Cholesterin, Triglyzeride, Apo B, Lp(a), Diabetes mellitus, Hypertonus, BMI, Rauchen und dem kardioprotektiven Faktor Apo AI wird der repräsentative Wert dieser Studie unterstrichen. Diese Risikofaktoren konnten auch in anderen Studien nachgewiesen werden (Mikkelsen, 2001/ Rosenberg, 2002/ Ito, 1999/ Murata, 1997/ Ozelo, 2004 (b)/ Mercier, 2000).

5.5. Weitere Polymorphismen des Glykoproteins Ib alpha

Der Dimorphismus Thr/Met¹⁴⁵ (HPA-2) des GPIb α ist einer der acht Polymorphismen, welche zusammen das humane Plättchen-Antigen-System (HPA) auf verschiedenen thrombozytären Glykoproteinen bilden (Hato, 1997). Alloantigene sind genetisch determinierte Molekülvarianten von Proteinen oder Kohlehydraten, die immunologisch von einigen Individuen erkannt werden können, wenn sie demjenigen Alloantigen ausgesetzt werden, welches sie selbst nicht besitzen (Warkentin, 1997). Der HPA-2-Polymorphismus wird auch als Ko^{a/b}- oder Sib^{a/b}-Polymorphismus bezeichnet (Mazzucato, 1996). Er entsteht durch den Austausch von Cytosin gegen Thymin am Nukleotid 1018 (Wenger, 1988), welcher in einem Aminosäureaustausch Threonin (ACG) in HPA-2a (Ko^b) gegen Methionin (ATG) in HPA-2b (Ko^a) an Aminosäureposition 145 resultiert (Wenger, 1988/ Aramaki, 1999/ Kandzari, 2001/ Kuijpers, 1992 (a)/ Simsek, 1994). Thr¹⁴⁵ (HPA-2a) ist das häufigere, Met¹⁴⁵ (HPA-2b) das seltenere Allel (Mazzucato, 1996/ Murata, 1992). Der Dimorphismus ist auf der 45kD-amino-terminalen Domäne des GPIb α lokalisiert (Kuijpers, 1992 (b)/ Kuijpers, 1992 (a)), im fünften leucinreichen Repeat (Li, 2000), in der Nähe der vWF - Bindungsstelle (Kuijpers, 1992 (b)). Eine Immunisierung gegen HPA-2^b kann zur neonatalen alloimmunen Thrombozytopenie (Bizzaro, 1988/ Simsek, 1994/ Ishida, 1991/ Kuijpers, 1992 (b)/ Warkentin, 1997/ Kiefel, 1994) und gegen HPA-2^a zum Refraktärzustand nach Thrombozytentransfusionen führen (Kiefel, 1994/ Saji, 1989/ Simsek, 1994/ Kuijpers, 1992 (b)). Einige Arbeitsgruppen fanden ein komplettes

Kopplungsungleichgewicht des HPA-2-Polymorphismus mit dem Längenpolymorphismus VNTR (Mikkelsen, 2001/ Clemetson, 1997/ Aramaki, 1999/ Kaski, 1996/ Ishida, 1995). Dabei soll das HPA-2^a (Methionin) mit dem VNTR-A und -B verbunden sein. Dieses Kopplungsungleichgewicht konnte in der hier untersuchten Population nicht bestätigt werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Es wird ein Zusammenhang zwischen dem HPA-2^b-Allel und dem Risiko für eine zerebrovaskuläre Erkrankung diskutiert (Sonada, 2001/ Gonzalez-Conejero, 1998). Dies konnte von Carlsson et al. nicht bestätigt werden (Carlsson, 1997). Andere Studien fanden eine Assoziation zwischen dem HPA-2^b-Allel und dem Risiko für die KHK (Gonzalez-Conejero, 1998) bzw. dem Ausprägungsgrad der KHK, dem Risiko eines MI und dem plötzlichen Herztod bei Patienten unter 55 Jahren (Mikkelsen, 2001). Die letztgenannte Studie wurde allerdings an Toten durchgeführt (Mikkelsen, 2001). Andere Studien konnten den Zusammenhang zwischen dem HPA-2-Polymorphismus und dem KHK-Risiko (Ito, 1999/ Speer, 1998), bzw. dem Risiko für einen MI nicht nachweisen (Rosenberg, 2002).

Ein weiterer Polymorphismus des GPIIb α befindet sich an Position -5 vor dem ATG-Startcodon (Afshar-Kharghan, 1999). Die Sequenzen, welche die ATG-Startcodons umgeben, werden Kozak-Sequenzen genannt und spielen eine große Rolle bei der effizienten Translation von Proteinen (Afshar-Kharghan, 1999). Dieser Polymorphismus tangiert also gar nicht das ATG-Startcodon selbst, sondern verändert die Umgebung der Initiationsstelle (Afshar-Kharghan, 1999). Der Polymorphismus basiert auf einem Austausch von Thymin gegen Cytosin (beides Pyrimidinbasen) an Position -5 vor dem ATG-Startcodon, wobei -5C das seltenere Allel ist (Afshar-Kharghan, 1999/ Ishida, 2000/ Meisel, 2001). Das Cytosin an Position -5 ähnelt am meisten der von Kozak beschriebenen Konsensussequenz (typischste Form einer Sequenz; der Erhalt einer Übereinstimmung signalisiert die funktionelle Wichtigkeit dieser Sequenz) (Afshar-Kharghan, 1999). Die Wildtyp-Sequenz mit -5T funktioniert so gut wie die Konsensus-Sequenz bei der Translation, das -5C-Allel soll aber noch effizienter sein und dadurch eine erhöhte Expression des GPIIb α auf der Zellmembran bewirken (Afshar-Kharghan, 1999). Im Gegensatz dazu konnten Corral et al. und Santoso et al. keinen Einfluß dieses Polymorphismus auf die Expression an GPIIb α feststellen (Corral, 2000/ Santoso, 2002). Allerdings fanden Santoso et al. bei ihrer

Studie eine stärkere Ausprägung der KHK (höherer Gensini-Score) bei Patienten unter 62 Jahren, die homozygot für Kozak-CC waren (Santoso, 2002). Andere fanden bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (instabile Angina pectoris, akuter MI) vermehrt das -5-C-Allel (Meisel, 2001), andere dagegen das -5-T-Allel bei Patienten mit mindestens einem MI (Douglas, 2002). Sonada et al. stellten einen Zusammenhang zwischen dem -5-C-Allel und dem Risiko für eine zerebrovaskuläre Erkrankung fest (Sonada, 2001).

Es wurden drei weitere Polymorphismen gefunden, die aber alle die Aminosäuresequenz nicht verändern: der RS-Polymorphismus an Position 3064, der EF-Polymorphismus an Position 3842 und der KL-Polymorphismus an Position 4142 (Kaski, 1996).

Ein Austausch von Cytosin gegen Thymin am Nukleotid 792 führt zu einem Aminosäureaustausch von Leucin gegen Phenylalanin an Position 70, welcher die Konsensus-Sequenz des zweiten leucinreichen Repeats in der vWF-Bindungsstelle des GPIIb α unterbricht (Matsubara, 2002). Die Ristocetin- (ein Aminoglykosid-Antibiotikum) und scherkraftinduzierte Thrombozytenaktivierung wird dadurch nicht beeinflusst (Matsubara, 2002). Ob dieser Polymorphismus einen Einfluß auf eine Blutungs- oder Thromboseneigung hat, ist bisher nicht bekannt (Matsubara, 2002).

5.6. *Therapeutische Bedeutung des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha*

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Assoziation zwischen den heterozygoten Genotypen des Längenpolymorphismus VNTR des GP Ib α und dem Risiko für eine KHK bzw. einen MI nachgewiesen werden.

Die zentrale Rolle der Thrombozyten bei der Entstehung der KHK und ihrer Komplikationen zeigt sich unter anderem bei der klinischen Wirksamkeit der Thrombozytenaggregationshemmung (Murata, 1998), wie z.B. dem spezifischen Aggregationshemmer gegen das GPIIb-IIIa auf Thrombozyten, sowie dem histologischen Nachweis thrombozytenreicher Thromben in verschlossenen Koronarien. Das GPIIb-IIIa folgt in der Aktivierungskaskade der Thrombozyten hinter dem hier

untersuchten GPIb-IX-V-Komplex. Eine Blockade des Rezeptor-Komplexes GPIb-IX-V könnte also das Risiko für die KHK und den MI bei Patienten mit heterozygoter Ausprägung des Längenpolymorphismus VNTR senken.

Bisher gibt es nur wenige funktionelle in vivo-Studien zum Einfluss der absoluten Länge bzw. des Längenunterschiedes des Längenpolymorphismus VNTR auf die Bindung an den vWF im Subendothel. Matsubara et al. (Matsubara, 2005) konnten zeigen, dass transfektierte chinesische Hamstero-varienzellen (CHO-Zellen), welche die längste VNTR-Variante A auf der Oberfläche trugen, deutlich langsamer auf immobilisierten vWF rollten, als solche mit der kürzesten Variante D. Dies deutet darauf hin, dass VNTR A intensiver an vWF bindet (Matsubara, 2005). Dies lässt aber die Tatsache außer acht, dass das GP Ib α nicht als einzelnes Molekül auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert wird, sondern als Komplex mit den Untereinheiten GP Ib β , GP IX und GP V (Clemetson, 1997/ Lopez, 1994 (a)/ Lopez, 1994 (b)/ Lopez, 1998). Diese vier Glykoproteine sind in einer festgelegten Stöchiometrie miteinander verbunden: 2 GPIb α : 2 GPIb β : 2 GPIX : 1 GPV (Clemetson, 1997/ Lopez, 1994 (b)/Lopez, 1998). Entsprechend liegt bei heterozygotem Genotyp ein Längenunterschied vor, der die Bindung an vWF beeinflussen könnte.

Hier sollten weitere funktionelle in vivo-Studien durchgeführt werden, ob Thrombozyten, die einen heterozygoten Genotyp des Längenpolymorphismus VNTR auf der Oberfläche tragen, durch hohe Scherkräfte schneller aktiviert werden bzw. der Zugang zum Rezeptor dadurch erleichtert wird, und somit leichter als homozygote Genotypen an vWF im subintimalen Gewebe binden, und damit eine KHK bzw. einen MI begünstigen, wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahe legen. Diese These wurde bereits von Afshar-Kharaghan et al. aufgestellt (Afshar-Kharaghan, 2004).

Sollte sich diese Hypothese bestätigen, so wären weitere Studien sinnvoll, die nach einem Thrombozytenaggregationshemmer gegen GP Ib α suchen, der in der Primär- und Sekundärprävention der KHK und des MI eingesetzt werden könnte.

6. Zusammenfassung

Der thrombozytäre Glykoprotein-Ib-IX-V-Komplex (GP Ib-IX-V) spielt eine zentrale Rolle in der initialen Adhäsion der Thrombozyten an den im Subendothel gebundenen von-Willebrand-Faktor (vWF) während der Bildung koronarer Thromben. Der Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ (VNTR) der thrombozytären GPIb α -Untereinheit wird als erblicher Risikofaktor thromboembolischer Komplikationen angesehen.

In dieser Studie wurde die potentielle Assoziation zwischen den verschiedenen VNTR-Allelen und der Häufigkeit der koronaren Herzkrankheit (KHK) und des Myokardinfarktes (MI) an 439 gesunden männlichen Probanden und 2272 männlichen Patienten, welche einer Koronarangiographie unterzogen wurden, untersucht. In der Gesamtgruppe konnte keine Assoziation zwischen GPIb α VNTR-Varianten und dem Risiko für die KHK und den MI gefunden werden. Interessanterweise zeigte der Vergleich zwischen den Heterozygoten und den Homozygoten eine Tendenz der Überrepräsentation der heterozygoten Individuen bei Patienten mit KHK ($p = 0,068$) und MI ($p = 0,068$). Das Risiko einer KHK ($p = 0,006$) und eines MI ($p = 0,015$) waren bei Heterozygoten in Untergruppen erhöht, welche einen hohen Apolipoprotein AI-Spiegel und einen niedrigen Apolipoprotein B-Spiegel aufwiesen. Dies indiziert, dass ein proatherogener Effekt des Längenunterschiedes des GPIb α von größerer Wichtigkeit in Niedrigrisikogruppen mit einem günstigen Lipidprofil sein könnte.

Die vorliegende Studie liefert Hinweise, dass der Längenunterschied der GPIb α -Isoformen des GPIb-IX-V-Komplexes einen genetischen Risikoindikator für Atherothrombose bei Heterozygoten darstellt.

7. Summary

Platelet glycoprotein Ib-IX-V (GP Ib-IX-V) receptor complex plays a key role in the initial adhesion of platelets to subendothelium-bound von Willebrand factor during the formation of coronary thrombi. The length polymorphism “variable number of tandem repeats” (VNTR) of the platelet GPIb α subunit is regarded an inherited genetic risk factor for thromboembolic complications.

In this study the potential association between different VNTR alleles and the frequency of coronary heart disease (CHD) and myocardial infarction (MI) among 469 healthy individuals and 2272 male participants who underwent coronary angiography was studied. In the total sample there was no association found between GPIb α VNTR-variants and the risk of CHD or MI. Interestingly, comparison between heterozygotes and homozygotes revealed a tendency towards an overrepresentation of heterozygous individuals in patients with CHD ($p = 0,068$) and MI ($p = 0,068$). The risk of CHD ($p = 0,006$) and of MI ($p = 0,015$) were increased in heterozygotes in subgroups of individuals with high apolipoprotein AI plus low apolipoprotein B levels indicating that a proatherogenic effect of GPIb α length disparity may be of higher importance in low-risk groups with favorable lipid profile.

This study indicates that length disparity of GPIb α isoforms within the GPIb-IX-V complex represents a genetic risk indicator for atherothrombosis with heterozygotes being at risk.

8. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A.	Arteria
Å	Ångström (10^{-10} m)
Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Apo (a)	Apolipoprotein (a)
Apo AI	Apolipoprotein AI
Apo B	Apolipoprotein B
Aqua dest	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index
bp	Base Pair
C	Cytosin
°C	Celsius
CD	Cluster of Differentiation
Chol	Cholesterin
CHOP-PAP	Cholesterinoxidase-Peroxidase
dATP	Desoxyriboadenosintriphosphat
dCTP	Desoxyribocytidintriphosphat
dGTP	Desoxyriboguanosintriphosphat
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxyribothymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
G	Guanin
g	Gramm

g	Erdbeschleunigung
GP	Glykoprotein
GPO-PAP	Glucosephosphatoxidase-Peroxidase
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoff
HCl	Wasserstoffchlorid
HDL	High Density Lipoprotein
HEPES	2-[4-(2-Hydroxymethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPA	humanes Plättchen-Alloantigen
HT	Hypertonus
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton (1 Da= Masse des Wasserstoffatoms)
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzkrankheit
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
LAO	Left Anterior Oblique
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
Lp (a)	Lipoprotein (a)
LRR	leucinreiche Repeats
m	Meter
mm	Millimeter
m ²	Quadratmeter
M	molar
Met	Methionin
mg	Milligramm
Mg ⁺⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MI	Myokardinfarkt

min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mM	millimolar
mmol	Millimol
Mol	1 Mol= 6×10^{23} Moleküle einer Substanz
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium
NADP	Nicotinamadeninnucleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamadeninnucleotidphosphat (reduzierte Form)
ng	Nanogramm
NIH	National Institute of Health
nm	Nanometer
nM	nanomolar
nmol	Nanomol
O ₂	Sauerstoff
OR	Odds Ratio
p	Signifikanz
PAI-1	Plasminogen-Activator-Inhibitor
pAVK	periphere arterielle Verschlußkrankheit
pH	potentia hydrogenii (negativer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration)
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-Ethansulfonsäure)
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PTCA	Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty
RAO	Right Anterior Oblique
RCOOH	freie Fettsäure
Sec	Sekunde
ssDNA	Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure
T	Thymin
Tab	Tabelle
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer

TG	Triglyzeride
TIA	transitorische ischämische Attacke
t-PA	Tissue-Type-Plasminogen-Activator
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
µmol	Mikromol
V	Volt
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO	World Health Organisation

9. Tabellenverzeichnis

Seite

Tab. 1: Gegenüberstellung von Stenosegrad und entsprechendem „Severity Score“ nach Gensini	23
Tab. 2: Angabe der Multiplikationsfaktoren für die jeweiligen Koronararterienabschnitte nach Gensini	24
Tab. 3: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Bestimmung der Triglyzeridkonzentration im Serum	29
Tab. 4: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Bestimmung der Cholesterinkonzentration im Serum	31
Tab. 5: Zusammensetzung der Reagenzien zur Bestimmung der Glucosekonzentration im Serum	36
Tab. 6: Reaktionsgemisch zur Amplifikation der DNA des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“	40
Tab. 7: Nukleotidsequenzen der Primer	40
Tab. 8: Amplifikationsbedingungen der Polymerase –Chain-Reaction zum Nachweis des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des thrombozytären Glykoproteins Ib alpha	41
Tab. 9: Nachweis etablierter Risikofaktoren und protektiver Faktoren der koronaren Herzkrankheit	54
Tab. 10: Nachweis etablierter Risikofaktoren und protektiver Faktoren des Myokardinfarktes	55
Tab. 11: Verteilung der verschiedenen Genotypen in der Studienpopulation	56
Tab. 12: Verteilung der Genotypen in der Kontrollgruppe sowie in den Gruppen der koronarangiographierten Patienten mit und ohne koronare Herzkrankheit	57
Tab. 13: Verteilung der verschiedenen Genotypen in der Kontrollgruppe sowie in den Gruppen der koronarangiographierten Patienten mit und ohne Myokardinfarkt	58
Tab. 14: Vergleich der klinischen und klinisch-chemischen koronaren Risikofaktoren/ protektiven Faktoren bei den vier häufigsten Genotypen BC, BD, CC und CD des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“	59
Tab. 15: Genotypen des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha und das Risiko für eine koronare Herzkrankheit	60
Tab. 16: Risiko für eine koronare Herzkrankheit bei CD- und BC-Heterozygoten gegenüber anderen Genotypen des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“	61

Tab. 17: Risiko für die koronare Herzkrankheit bei heterozygoten und homozygoten Genotypen des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“	61
Tab. 18: Heterozygote Genpolymorphismen als Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit in Niedrigrisikogruppen mit günstigem Lipidprofil	63
Tab. 19: Genotypen des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha und das Risiko für einen Myokardinfarkt	65
Tab. 20: Risiko für einen Myokardinfarkt bei CD- und BC-Heterozygoten gegenüber den anderen Genotypen des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“	65
Tab. 21: Risiko für einen Myokardinfarkt bei heterozygoten und homozygoten Genotypen des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“	66
Tab. 22: Heterozygote Genpolymorphismen als Risikofaktoren des myokardinfarktes in Niedrigrisikogruppen mit günstigem Lipidprofil	67

10. Abbildungsverzeichnis

Seite

Abb. 1: Ätiologie der Atherosklerose	3
Abb. 2: Aufbau des Glykoprotein Ib-IX-V-Komplexes	9
Abb. 3: Die Allele A, B, C und D des Längenpolymorphismus „variable number of tandem repeats“ des Glykoproteins Ib alpha	13
Abb. 4: Gegenüberstellung von radiologisch sichtbaren Koronararterienverengungen und entsprechendem „Severity Score“	25
Abb. 5: Abschnitte der Koronararterien mit den jeweiligen Multiplikationsfaktoren	26
Abb. 6: Reaktionsgleichungen zur Bestimmung der Triglyzeridkonzentration im Serum	28
Abb. 7: Reaktionsgleichungen zur Bestimmung der Cholesterinkonzentration im Serum	31
Abb. 8: Reaktionsgleichungen zur Bestimmung der Glucosekonzentration im Serum	36
Abb. 9: Darstellung der vier Genotypen anhand zweier homozygoter und drei heterozygoter Probanden	42
Abb. 10: Einteilung der Gesamtpopulation in Altersdekaden	47
Abb. 11: Gensini-Score in Abhängigkeit von der koronaren Herzkrankheit	48
Abb. 12: Risiko der koronaren Herzkrankheit in Abhängigkeit vom Lebensalter	49
Abb. 13: Myokardinfarkttrisiko in Abhängigkeit vom Lebensalter	50
Abb. 14: Zusammenhang zwischen koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt	51
Abb. 15: Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der koronaren Herzkrankheit und dem Myokardinfarkt	52
Abb. 16: Abhängigkeit des Gensini-Scores vom erlittenen Myokardinfarkt	53

11. Literaturverzeichnis

Afshar-Kharghan V, Gineys G, Schade AJ, Sun L, Li CQ, McIntire LV, Dong JF, Lopez JA: Necessity of conserved asparagine residues in the leucine-rich repeats of platelet glycoprotein Ib alpha for the proper conformation and function of the ligand-binding region. *Biochemistry* 2000, 39 (12): 3384-3391

Afshar-Kharghan V, Li CQ, Khoshnevis Asl M, Lopez JA: Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein (GP) Ib alpha gene is a major determinant of the plasma membrane levels of the platelet GP Ib-IX-V complex. *Blood* 1999, 94(1): 186-191

Afshar-Kharghan V, Matijevic-Aleksic N, Ahn C, Boerwinkle E, Wu KK, Lopez JA: The variable number of tandem repeat polymorphism of platelet glycoprotein Ib(alpha) and risk of coronary heart disease. *Blood* 2004, 103(3): 963-965

Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Whisstock JC, Berndt MC: Glycoprotein Ib-IX-V. *Int J Biochem Biol* 2003, 35 (8): 1170-1174

Andrews RK, Shen Y, Gardiner EE, Dong JF, Lopez JA, Berndt MC: The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signalling. *Thromb Haemost* 1999, 82(2): 357-364

Angles-Cano E, de la Pena Diaz A, Loyau S: inhibition of fibrinolysis by lipoprotein (a): *Ann N Yn Acad Sci* 2001, 936: 261-275

Aramaki KM, Reiner AP: A novel isoform of platelet glycoprotein Ib alpha is prevalent in African Americans. *Am J Hematol* 1999, 60(1): 77-79

Assmann G, Schulte H: Identification of individuals at high risk for myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1994, 110 Suppl: 11-21

Assmann G, Schulte H: The prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study: Prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/ or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease. *Am Heart J* 1988 116(6 PT2): 1713-1724

Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH, Fuster V: von Willebrand factor and cardiovascular disease. *Thrombosis and Haemostasis*, 1993 (a), 70(1): 111-118

Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L: Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease. *Circulation* 1993 (b), 87 (3 Suppl): II3-16

Benson G: Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 1999, 27(2): 573-580

Berliner JA, Navab M, et al: Atherosclerosis: Basic Mechanisms, oxidation, inflammation and genetics. *Circulation* 1995, 91 (9): 2488-2496

Berndt MC, Shen Y, Dopheide SM, Gardiner EE, Andrews RK: The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V-complex. *Thromb Haemost* 2001, 86 (1): 178-188

Bizzaro N, Dianese G: Neonatal alloimmune amegakaryocytosis, *Vox Sang* 1988, 54: 112-114

Braunwald E: Unstable angina. A classification. *Circulation* 1989, 80(2): 410-414

Bray PF: Integrin polymorphisms as risk factors for thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis* 1999, 82(2): 337-344

Carlsson LE, Greinacher A, Spitzer C, Walther R, Kessler C: Polymorphisms of the human platelet antigens HPA-1, HPA-2, HPA-3 and HPA-5 on the platelet receptors for Fibrinogen (GPIIb/ GPIIa), von Willebrand factor (GPIb/ IX) and collagen (GPIa/ IIa) are not correlated with an increased risk for stroke. *Stroke* 1997, 28 (7): 1392-1394

Castelli WP, Anderson K: A population at risk. Prevalence of high cholesterol levels in hypertensive patients in the Framingham Study. *Am J Med* 1986, 80 (2a): 23-32

Chapman MJ, Huby T, Nigon F, Thillet J: Lipoprotein (a): implication in atherothrombosis. *Atherosclerosis* 1994, 110 Suppl: 69-75

Clemetson KJ: Platelet GP Ib-V-IX complex. *Thromb Haemost* 1997, 78(1): 266-270

Corral J, Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Vicente V: New alleles of the platelet glycoprotein Ib alpha gene. *Br J Haematol* 1998, 103(4): 997-1003

Corral J, Lozano ML, Gonzalez-Conejero R, Martinez C, Iniesta JA, Rivera J, Vincente V: A common polymorphism flanking the ATG initiator codon of GP Ib alpha does not affect expression and is not a major risk factor for arterial thrombosis. *Thromb Haemost* 2000, 83(1): 23-28

Cullen P, Assmann G: High risk strategies for atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 1999, 286(1-2): 31-45

Cullen P, von Eckardstein A, Assmann G: Diagnosis and management of new cardiovascular risk factors. *Eur heart J* 1998, 19Suppl O: O13-019

De Groot PG: The role of von Willebrand factor in platelet function. *Semin Thromb Hemost* 2002, 28 (2): 133-138

Douglas H, Michaelides K, Gorog DA, Durante-Mangoni E, Ahmed N, Davies GJ, Tuddenham EG: Platelet membrane glycoprotein Ib alpha gene -5T/C Kozak sequence polymorphism as an independent risk factor for the occurrence of coronary thrombosis. *Heart* 2002, 87(1): 70-74

Du X, Booth WJ, Castaldi PA, Berndt MC: Polymorphism of platelet glycoprotein Ib associated with variability of the 85 kDa macroglycopeptide region. *Nouv Rev Fr Hematol* 1992, 34(1): 67-72

Duriez P, Dallongeville J, Fruchart JC: Lipoprotein (a) as a marker for coronary heart disease. *Br J Clin Pract Suppl* 1996, 77 A: 54-61

Ehlers R, Ustinov V, Chen Z, Zhang X, Rao R, Luscinskas FW, Lopez J, Plow E, Simon DI: Targeting platelet-leukocyte interactions: identification of the integrin Mac-1 binding site for the platelet counter receptor glycoprotein Ib alpha. *J Exp Med* 2003, 198(7): 1077-1088

Englund GD, Bodnar RJ, Li Z, Ruggeri ZM, DU X: Regulation of von Willebrand factor binding to the platelet glycoprotein Ib-IX by a membrane skeleton-dependent inside-out signal. *J Biol Chem* 2001, 276 (20): 16952-16959

Folsom AR, Szklo M, Stevens J, Liao F, Smith R, Eckfeldt JH: a prospective study of coronary heart disease in relation to fasting insulin, glucose, and diabetes. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Diabetes Care* 1997, 20(6): 935-942

Francis MC, Frohlich JJ: Coronary artery Disease in patients at low risk- apolipoprotein AI as an independent risk factor. *Atherosclerosis* 2001, 155 (1): 165-170

Fredrickson BJ, Dong JF, McIntire LV; Lopez JA: Shear-dependent rolling on von Willebrand factor of mammalian cells expressing the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *Blood* 1998, 92 (10): 3684-3693

Fried LP, Borhani NO, Enright P, Furberg CD, Gardin JM, Kronmal RA, Kuller LH, Manolio TA, Mittelmark MB, Newman A, O'Leary DH, Psaty B, Rautharju P, Tracy RP, Weiler PG: The Cardiovascular Health Study: Design and Rationale. *Ann Epidemiol* 1991, 1 (3): 263-276

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndrome. *The new England Journal of Medicine* 1992, 326 (4): 242-250

Garcia Frade LJ, Alvarez JJ, Rayo I, Torrado MC, Lasuncion MA, Garcia Avello A, Hernandez A, Marin E: fibrinolytic parameters and lipoprotein (a) levels in plasma of patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 1991, 63(4): 407-418

Gaziano JM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, Breslow JL, Buring JE: Fasting triglycerides, high-density lipoprotein, and risk of myocardial infarction. *Circulation* 1997, 96 (8): 2520-2525

Gensini GG (1983) A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease. *Am. J. Cardiol* 1983, 51(3): 606

Geurian K, Pinson JB, Weart CW: The triglyceride connection in atherosclerosis. *Ann Pharmacothr* 1992, 26 (9): 1109-1117

Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Corral J, Iniesta JA, Moraleda JM, Vincente V: Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib alpha associated with arterial thrombotic disease. *Blood* 1998, 92 (8): 2771-2776

Grant PJ: The genetics of atherothrombotic disorders: a clinician's view. *J Thromb Haemost* 2003, 1 (7): 1381-1390

Hato T, Minamoto Y, Fukuyama T, Fujita S: Polymorphisms of HPA-1 Through 6 on Platelet membrane Glycoprotein Receptors Are Not A Genetic Risk Factor for Myocardial Infarction in the Japanese Population. *Am J Cardiol* 1997, 80(9): 1222-1224

Homma Y: Predictors of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2004, 11(5): 265-270

Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RA, Schiphorst ME, de Groot PG, Sixma JJ, Gros P: Structures of glycoprotein Ib alpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science* 2002, 297 (5584): 1176-1179

Ishida F, Furihata K, Ishida K, Kodaira H, Han KS, Da-Zhuang L, Kitano K, Kiyosawa K: The largest isoform of platelet membrane glycoprotein Ib alpha is commonly distributed in Eastern Asian populations. *Thrombosis and Haemostasis* 1996, 76(2): 245-247

Ishida F, Furihata K, Ishida K, Yan J, Kitano K, Kiyosawa K, Furuta S: The largest variant of platelet glycoprotein Ib alpha has four tandem repeats of 13 amino acids in the macroglycopeptide region and a genetic linkage with methionine 145. *Blood* 1995, 86(4): 1357-1360

Ishida F, Ito T, Takei M, Shimodaira S, Kitano K, Kiyosawa K: Genetic linkage of Kozak sequence polymorphism of the platelet glycoprotein Ib alpha with human platelet antigen-2 and variable number of tandem repeats polymorphism, and its relationship with coronary artery disease. *Br J Haematol* 2000, 111(4): 1247-1249

Ishida F, Saji H, Maruya E, Furihata K: Human platelet-specific antigen, Sib^a, is associated with the molecular weight polymorphism of glycoprotein Ib alpha. *Blood* 1991, 78, (7): 1722-1729

Ito T, Ishida F, Shimodaira S, Kitano K: Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib alpha and plasma von Willebrand factor antigen in coronary artery disease. *Int J Hematol* 1999, 70(1): 47-51

Jelakovic B, Laganovic M, Kuzmanic D: Lipoprotein (a) - a mysterious factor in atherogenesis. *Lijec Vjesn* 2002, 124(11-12): 366-371

Jilma-Stohlawetz P, Homoncik M, Jilma B, Knechtelsdorfer M, Unger P, Mannhalter C, Santoso S, Panzer S: Glycoprotein Ib polymorphisms influence platelet plug formation und high shear rates. *Br J Haematol* 2003, 120 (4): 652-655

Kandzari DE, Goldschmidt-Clermont PJ: Platelet polymorphisms and ischemic heart disease: moving beyond traditional risk factors. *J Am Coll Cardiol* 2001, 38(4): 1028-1032

Kaski S, Kekomaki R, Partanen J: Systemic screening for genetic polymorphism in human platelet glycoprotein Ib alpha. *Immunogenetics* 1996; 44(3): 170-176

Kenny D, Muckian C, Fitzgerald DJ, Cannon CP, Shields DC: Platelet glycoprotein Ib alpha receptor polymorphisms and recurrent ischaemic events in acute coronary syndrome patients. *J Thromb Thrombolysis* 2002, 13(1): 13-19

Kiefel V, Kroll H, Mueller-Eckhardt C: Neonatale Alloimmunthrombozytopenie. *Dtsch Med Wschr* 1994, 119: 1512-1517

Kohler E, Bentrup A, Funke H, Sandkamp M, Schulte H, Assmann G: Untersuchungen zur Beziehung zwischen Lipidstoffwechselstörungen und Erstmanifestationsalter der KHK. *Z Kardiol* 1992, 81(7): 354-360

Kottke BA, Zinsmeister AR, Holmes DR, Kneller RW, Hallaway BJ, Mao SJ: Apolipoproteins and coronary artery disease. *Mayo Clin Proc* 1986, 61(5): 313-320

Kuijpers RWAM, Faber NM, Cuypers H Th M, Ouwehand WH, Von dem Borne : NH₂-terminal globular domain of human paltelet glycoprotein Ib alpha has a methionine¹⁴⁵/Threonine¹⁴⁵ amino acid polymorphism, which is associated with the HPA-2(Ko) alloantigens. *J Clin Invest* 1992 (a), 89: 381-384

Kuijpers RWAM, Ouwehand WH, Bleeker PMM, Christie D, von dem Borne AEG: Localisation of the platelet-specific HPA-2 (Ko) alloantigens on the N-termianl globular fragment of platelet glycoprotein Ib alpha. *Blood* 1992 (b), 79 (1): 283-288

Lenzi S, Scanu A, De Caterina R: Lipoprotein (a) as an athero-thrombotic risk factor: epidemiologic evidence and possible pathogenetic mechanisms. *G ital Cardiol* 1996, 26(10): 1203-1225

Li CQ, Dong JF, Lopez JA: The mucin-like macroglycopeptide region of glycoprotein Ib alpha is required for cell adhesion to immobilized von Willebrand factor (vWF) under flow but not for static vWF binding. *Thromb Haemost* 2002, 88 (4): 673-677

Li CQ, Garner SF, Davies J, Smethurst PA, Wardell MR, Ouwehand WH: Threonine-145/ Methionine-145 variants of baculovirus produced recombinant ligand binding domain of GPIb alpha express HPA-2 epitopes and show equal binding of von Willebrand factor. *Blood* 2000, 95 (1): 205-211

Link N, Tanner M: coronary artery disease: Part 1. Epidemiology and diagnosis. *West J med* 2001, 174(4): 257-261

Lopez JA: The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994 (a), 5(1): 97-119

Lopez JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC: Bernard-Soulier Syndrome. *Blood* 1998, 91 (12): 4397-4418

Lopez JA, Ludwig EH, McCarthy BJ: Polymorphism of human glycoprotein Ib alpha results from a variable number of tandem repeats of a 13-amino acid sequence in the mucin-like macroglycopeptide region. *J of Biological Chemistry* 1992, 267 (14): 10055-10061

Lopez JA, Weisman S, Sih T, Li CQ, Sanan DA: Association of GP Ib with actin-binding protein does not require GP IX. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994 (b), 5(4): 479-485

Loscalzo J, Weinfeld M, Fless GM, Scanu AM: Lipoprotein (a), fibrin binding, and plasminogen activation. *Arteriosclerosis* 1990, 10 (2): 240-245

Luc G, Bard JM, Ferrieres J, Evans A, Amouyel P, Arveiler D, Fruchart JC, Ducimetiere P: Value of HDL cholesterol, apolipoprotein AI, lipoprotein AI, and lipoprotein AI/AII in prediction of coronary heart disease: the PRIME Study. Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, 22(7): 1155-1161

Marcovina SM, Hegele RA, Koschinsky ML: Lipoprotein (a) and coronary heart disease risk. *Curr Cardiol Rep* 1999, 1(2): 105-111

Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M: A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med*. 2002, 196 (7): 887-896

Matsubara Y, Murata M, Hayashi T, Suzuki K, Okamura Y, Handa M, Ishihara H, Shibano T, Ikeda Y: Platelet glycoprotein Ib alpha polymorphisms affect the interaction with von Willebrand factor under flow conditions. *Br J Haematol* 2005, 128 (4): 533-539

Matsubara Y, Murata M, Moriki T, Yokoyama K, Watanabe N, Nakajima H, Handa M, Kawano K, Aoki N, Yoshino H, Ikeda Y: A novel polymorphism, 70 Leu/Phe, disrupts a consensus Leu residue within the leucine-rich repeat sequence of platelet glycoprotein Ib alpha. *Thromb Haemost* 2002, 87 (5): 867-872

Mazzucato M, Pradella P, de Anglis V, Steffan A, de Marco L: Frequency and functional relevance of genetic threonine145/ methionine 145 dimorphism in platelet glycoprotein Ib alpha in an Italian population. *Transfusion* 1996, 36(19): 891-894

Meisel C, Afshar-Kharghan V, Cascorbi I, Laule M, Stangl V, Felix SB, Baumann G, Lopez JA, Roots I, Stangl K: Role of Kozak sequence polymorphism of platelet glycoprotein Ib alpha as a risk factor for coronary artery disease and catheter interventions. *J Am Coll Cardiol* 2001, 38(4): 1023-1027

Meisel C, Lopez JA, Stangl K: Role of platelet glycoprotein polymorphisms in cardiovascular diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2004, 369: 38-54

Melissari E, Monte G, Lindo VS, Pemberton KD, Wilson NV, Edmondson R, Das S, Kakkar VV: Congenital thrombophilia among patients with venous thromboembolism. *Blood Coagulation Fibrinolysis* 1992, 3(6): 749-758

Mercier B, Munier S, Bertault V, Mansourati J, Blanc JJ, Ferec C: Myocardial infarction: absence of association with VNTR polymorphism of GP Ib alpha. *Thromb Haemost* 2000, 84(5): 921-922

Meyer M, Schellenberg I: Platelet membrane glycoprotein Ib: genetic polymorphism detected in the intact molecule and in proteolytic fragments. *Thrombosis research* 1990, 58: 233-242

Mikkelsson J, Perola M, Penttilä A, Karhunen PJ: platelet glycoprotein Ib alpha HPA-2Met/ VNTR B haplotype as a genetic predictor of myocardial infarction and sudden cardiac death. *Circulation* 2001, 104(8): 876-880

Modderman PW, Admiraal LG, Sonnenberg A, von dem Borne AE: Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane. *J Biol Chem* 1992, 267(1): 264-269

Moroi M, Jung SM, Yoshida N: Genetic polymorphism of platelet glycoprotein Ib. *Blood* 1984, 64 (3): 622-629

Muckian C, Hillmann A, Kenny D, Shields DC: A novel variant of the platelet glycoprotein Ib alpha macroglycopeptide region lacks any copies of the “perfect” 13 amino acid repeat. *Thromb Haemost* 2000, 83(3): 513-514

Mullis KB: The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990, 262(4): 36-43

Mullis K, Faloona FA: Specific Synthesis of DNA *in Vitro* via a Polymerase-Catalysed Chain reaction. *Methods in Enzymology* 1987, 155 (21): 335-350

Murata M, Furihata K, Ishida F, Russell SR, Ware J, Ruggeri ZM: Genetic and structural characterization of an amino acid dimorphism in glycoprotein Ib alpha involved in platelet transfusion refractoriness. *Blood* 1992, 79 (11): 3086-3090

Murata M, Kawano K, Matsubara Y, Ishikawa K, Watanabe K, Ikeda Y: genetic polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24(3): 245-250

Murata M, Matsubara Y, Kawano K, Zama T, Aoki N, Yoshino H, Watanabe G, Ishikawa K: Coronary artery disease and polymorphisms in a receptor mediating shear stress-dependent platelet activation. *Circulation* 1997, 96(19): 3281-3286

Nieswandt B, Aktas B, Moers A, Sachs UJH: Platelets in atherothrombosis: lessons from mouse models. *J Thromb Haemost* 2005, 3: 1725-1736

Nurden AT: Polymorphisms of human platelet membrane glycoproteins: structure and clinical significance. *Thromb Haemost* 1995, 74(1): 345-351

Nuytens BP, Thijs T, Deckmyn H, Broos K: Platelet adhesion to collagen. *Thromb Res* 2011, 127 Suppl (2): 26-29

Ozelo MC, Costa DSP, Siqueira LH, Machado TMF, Castro V, Goncalves MS; Menezes RC, Soares M, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, Arruda VR: Genetic Variability of Platelet Glycoprotein Iba Gene. *Am J Hematol* 2004 (a), 77 (2): 107-116

Ozelo MC, Origa AF, Aranha FJ, Mansur AP, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, Pollak ES, Arruda VR: Platelet glycoprotein Ib alpha polymorphisms modulate the risk for myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2004 (b), 92 (2): 384-286

Reaven GM: Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol Rev* 1995, 75(3): 473-486

Rees DC, Cox M, Clegg JB: World distribution of factor V Leiden. *The Lancet* 1995, Vol 346: 1133-1134

Reiner AP, Siscovick DS, Rosendaal FR: Platelet glycoprotein gene polymorphisms and risk of thrombosis. Facts and fancies. *Rev Clin Exp Hematol* 2001, 5 (3): 262-287

Reinhart RA, Gani K, Arndt MR, Broste SK: Apolipoproteins AI and B as predictors of angiographically defined coronary artery disease. Arch Intern Med 1990, 150(8): 1629-1633

Ridker PM, Stampfer MJ: Assessment of genetic markers for coronary thrombosis: promise and precaution. The Lancet 1999, Vol 353: 687-688

Riesen WF: Lipoprotein (a) - link between lipid metabolism and coagulation system? Schweiz Med Wochenschr 1991, 121(49): 1813-1818

Romo GM, Dong JF, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, McIntire LV, Berndt MC, Lopez JA: The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. J Exp Med 1999, 190(6): 803-814

Rose GA: The Diagnosis of Ischaemic Heart Pain and Intermittent Claudication in Field Surveys. Bull Wld Hlth Org 1962, 27: 645-658

Rosenberg N, Zivelin A, Chetrit A, Darik R, Kornbrot N, Freimark D, Inbal A: Effects of platelet membrane glycoprotein polymorphisms on the risk of myocardial infarction in young males. Isr Med Assoc J 2002, 4 (6): 411-414

Roth GJ: A new “kid” on the platelet thrombin receptor “block”: glycoprotein Ib-IX-V. Proc Natl Acad Sci USA 2001, 98(4): 1330-1331

Roth GJ, Yagi M, Bastian LS: The platelet glycoprotein Ib-V-IX system: regulation of gene expression. Stem Cells 1996;14 Suppl 1: 188-193

Ruggeri ZM: Structure and function of von Willebrand factor. Thromb Haemost 1999 (a), 82 (2): 576-584

Ruggeri ZM; Dent JA, Salivar E: Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. Blood 1999 (b), Vol 94: 172-178

Sahi N, Pahlajani DB, Sainani GS: Apolipoproteins AI and B as predictors of angiographically assessed coronary artery disease. J Assoc Physicians India 1993, 41(11): 713-715

Saji H, Maruya E, Fuji H, Maekawa T, Akiyama Y, Matsuura T, Hosoi T: New platelet antigen, Sib^a involved in platelet transfusion refractoriness in a Japanese man. Vox Sang 1989, 56: 283-287 (zitiert bei Kaski et al, Immunogenetics,1996)

Sandhofer F: Physiologie und Pathophysiologie des Stoffwechsels der Lipoproteine. Wien Med Wochenschr 1994, 144 (12-13): 286-290

Santoso S, Zimmermann P, Sachs UJ, Gardemann A: The impact of the Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein Ib alpha gene on the risk and extent of coronary heart disease. Thromb Haemost 2002, 87 (2): 345-346

Schaefer JR, Herzum M: Arteriosklerose und koronare Herzerkrankung - Stärken und Lücken im klassischen Risikofaktorenkonzept; Herz 1998, 23(3): 153-162

Schutzbank TE, Stern HJ: Principles and applications of the polymerase chain reaction. J Int Fed Clin Chem 1993, 5(3): 96-105

Schwandt P: Triglyceride-rich lipoproteins and atherosclerosis. Drugs 1990, 40, Suppl 1: 38-41

Seibaek M, Sloth C, V allebo L, Hansen T, Urhammer SA, Burchardt H, Torp-Pedersen C, Pedersen O, Hildebrandt P: glucose tolerance status and severity of coronary artery disease in men referred to coronary arteriography. Am Heart J 1997, 133(6): 622-629

Selzer A, On the limitation of therapeutic intervention trials in ischemic heart disease: a clinician's viewpoint. Am J Cardiol 1982; 49(1): 252-255

Shen Y, Romo GM, Dong J, Schade A, McIntire LV, Kenny D, Whisstock JC, et al: Requirement of leucine-rich repeats of glycoprotein Ib alpha for shear-dependent and static binding of von Willebrand factor to the platelet membrane GP Ib-IX-V complex. *Blood* 2000, 95 (3): 903-910

Sigurdsson G, Baldursdottir A, Sigvaldason H, Agnarsson U, Thorgeirsson G, Sigfusson N: Predictive value of apolipoproteins in a prospective survey of coronary artery disease in men. *Am J Cardiol* 1992, 69(16): 1251-1254

Silbernagl S, Lang F: Taschenatlas der Pathophysiologie, Thieme Verlag 1998

Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J, McIntire LV, Ballantyne CM, Zhang L, Furman MI, Berndt MC, Lopez JA: Platelet glycoprotein Ib alpha is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18): *J Exp Med* 2000, 192(2): 193-204

Simsek S, Bleeker PM, van der Schoot CE, von dem Borne AE: Association of a variable number of tandem repeats (VNTR) in glycoprotein Ib alpha and HPA-2 alloantigens. *Thromb Haemost* 1994, 72(5): 757-761

Sonoda A, Murata M, Ikeda Y, Fukuuchi Y, Watanbe K. Stroke and platelet glycoprotein Ib alpha polymorphisms. *Thromb Haemost* 2001, 85(3): 573-574

Speer WR, Huber K, Roden M, Janisiw M et al: Inherited Platelet Glycoprotein polymorphisms and a risk for coronary heart disease in young central Europeans. *Thrombosis Research* 1998, 90: 117-123

Srivastava RA, Srivastava N: High density lipoprotein, apolipoprotein AI and coronary artery disease. *Mol Cell Biochem* 2000, 209(1-2): 131-144

Stout RW: Hyperinsulinaemia- a possible risk factor for cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Horm Metab Res Suppl* 1985 (a), 15: 37-41

Stout RW: Insulin and atheroma. 20-yr perspective. Diabetes Care 1990, 13(6): 631-654

Stout RW: Overview of the association between insulin and Atherosclerosis. Metabolism 1985 (b), 34(12 Suppl 1): 7-12

Sugimoto M, Miyata S: Functional property of von Willebrand factor under flowing blood. Int J Hematol 2002, 75 (1): 19-24

Talmud PJ, Hawe E, Miller GJ, Humphries SE: Nonfasting apolipoprotein B and triglyceride levels as a useful predictor of coronary heart disease risk in middle-aged UK men. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002, 22(11): 1918-1923

Testa R, Marcovina SM: The rate of plasmin formation after in vitro clotting is inversely related to lipoprotein (a) plasma levels. INT J Clin Lab Res 1999, 29(3): 128-132

Thiery J, Teupser D: Genetische Faktoren der Atheroskleroseentstehung. Z Kardiol 1998, 87(10): 777-788

Uff S, Clementson JM, Harrison T, Clementson KJ, Emsley J: Crystal structure of the platelet glycoprotein Ib (alpha) N-terminal domain reveals an unmasking mechanism for receptor activation. J Biol Chem 2002, 277 (38): 35657-35663

Walter DH, Zeiher AM: Genetische Risikofaktoren für den Myokardinfarkt. Herz 2000, 25(1): 7-14

Warkentin TE, Smith JW: The alloimmune thrombocytopenic Syndromes. Transfusion Medicine Reviews 1997, 11 (4): 296-307

Wenger RH, Kieffer N, Wicki AN, Clementson KJ: Structure of the human blood platelet membrane glycoprotein Ib alpha gene. Biochem Biophys Res Commun 1988, 156(1): 389-395

Whisstock JC, Shen Y, Lopez JA, Andrews RK, Berndt MC: Molecular modeling of the seven tandem leucine-rich repeats within the ligand-binding region of platelet glycoprotein Ib alpha. *Thromb Haemost* 2002, 87 (2): 329-333

Winkelmann BR, Hager J et al: Genetics of coronary heart disease: current knowledge and research principles. *Am Heart J* 2000, 140 (4): 11-26

Wong ND, Wilson PW; Kannel WB: Serum cholesterol as a prognostic factor after myocardial infarction: the Framingham Study. *Ann Inter Med* 1991, 115(9): 687-693

Zama T, Murata M, Ono F, Watanabe K, Watanabe R, Moriki T, Yokoyama K, Tokuhira M, Ikeda Y: Low prevalence of activated protein C resistance and coagulation factor V Arg506 to Gln mutation among Japanese patients with various forms of thrombosis, and normal individuals. *Int J Hematol* 1996, 65(1): 71-78

12. Erklärung zur Dissertation

“Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, daß Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden“

Ort, Datum

Unterschrift

13. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Gardemann für die freundliche Überlassung des Themas sowie Prof. Dr. med. Gregor Bein für die bereitwillige Zuverfügungstellung der Laborräumlichkeiten und Gerätschaften.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Sentot Santoso möchte ich mich für die kontinuierliche, hilfreiche und stets freundliche den üblichen Rahmen übertreffende Betreuung bedanken.